



EESTI MAAÜLIKOOL
Metsandus- ja maaehitusinstituut

Kätlin Piiskop

**JUURE- JA TÜVEMÄDANIKE KAHJUSTUSED 41-80
AASTASTES HARILIKU KUUSE (*PICEA ABIES* (L.)
KARST.) PUISTUTES**

ROOT AND STEM ROT DAMAGES IN 41-80 YEAR OLD
NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* (L.) KARST.) STANDS

Magistritöö
Metsamajanduse õppekava

Juhendajad:

Elisabeth Rähn, *MSc*

teadur Tiia Drenkhan, *PhD*

dotsent Rein Drenkhan, *PhD*

Tartu 2019

Eesti Maaülikool		Magistritöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014			
Autor: Kätlin Piiskop		Õppekava: Metsamajandus	
Pealkiri: Juure- ja tüvemädanike kahjustused 41-80 aastastes hariliku kuuse (<i>Picea abies</i> (L.) Karst.) puistutes			
Lehekülgi: 57	Jooniseid: 6	Tabeleid: 4	Lisasid: 1
Õppetool:	Metsakasvatuse ja metsaökoloogia		
Uurimisvaldkond:	Metsapatoloogia		
Juhendajad:	Elisabeth Rähn <i>MSc</i> , Tiia Drenkhan <i>PhD</i> , Rein Drenkhan <i>PhD</i>		
Kaitsmiskoht ja aasta: Tartu, 2019			
<p>Magistritöö olulisimaks eesmärgiks oli uurida hariliku kuuse enamusega puistutes juure- ja tüvemädanike esinemist vanusevahemikes 41-60 ja 61-80 aastat, analüüsida juuremädanike levikut harvendamata ja harvendatud puistutes ning välja selgitada teiste juuremädanike tekitavate seente liigiline koosseis kasutades uue põlvkonna DNA sekveneerimist.</p> <p>Juurdekasvuproovid (N=756) koguti 2016. ja 2017. aastal 63 proovialalt elusatel hariliku kuuse puudelt. Juurdekasvuproovidelt hinnati visuaalselt mädaniku olemasolu (perifeerne, tsentraalne ja tumenemine). Kogutud juurdekasvuproovidest (N=756) analüüsiti 252 puiduproovi Eesti Maaülikooli metsapatoloogia ja -geneetika laboris liigispetsiifiste DNA praimeritega juurepessu (<i>Heterobasidion</i> spp.), külmaseene (<i>Armillaria</i> spp.) ja verev nahkise (<i>Stereum sanguinolentum</i>) olemasolu tuvastamiseks ning 504 hariliku kuuse juurdekasvuproovi analüüsiti uue põlvkonna sekveneerimise (NGS) meetodil, et tuvastada lisaks juurepessu, külmaseene ja verev nahkise esinemisele ka teiste olulisemate seente esinemist puiduproovides.</p> <p>756 analüüsitavast hariliku kuuse juurdekasvuproovist olid juurepessu nakkusega 241 proovi, mis moodustab 31,9% uuritud proovide arvust. Vähesel määral tuvastati ka külmaseene (1,6%) ja verev nahkise (4,5%) esinemist.</p> <p>Harvendusraiate mõju hindamisel juurepessu osakaalule selgus, et harvendamata (33%) ja harvendatud (31%) puistute vahel ei esine statistilist olulist erinevust ($p>0,16$). Samuti ei ole juurepessu kahjustusel statistiliselt olulist erinevust ($p=0,44$) nooremas (41-60 a.) ja vanemas (61-80.a) kuuse enamusega puistutes. Analüüsides harvendusraiate teostamise hulga (harvendamata, 1x harvendatud, 2x harvendatud) mõju juurepessu levikule selgus, et</p>			

statistiliselt oluline erinevus ($p < 0,001$) esineb vaid nooremas (41-60 a.) vanusevahemikus, kus juurepessu esinemise osakaal oli madalam kaks korda harvendatud puistutes (8%) võrreldes üks kord harvendatud (50%) ja harvendamata (27%) puistutega. Juurepessu esinemisel vanemas (61-80 a.) vanusevahemikus statistilist olulist erinevust ($p > 0,05$) raiumata ja raiutud variantide vahel ei tuvastatud.

Kasvukohatüübi (sinilille, jänsekapsa ja naadi) ja diameetri koosmõjust juurepessu osakaalule selgus, et juurepessu poolt on suuremas diameetriklassis (70-80 cm) enam kahjustatud sinilille (50%), seejärel jänsekapsa (40%) ja naadi (30%) kasvukohatüübi kuusikud.

Uue põlvkonna sekveneerimisega analüüsi (N=504) teisi võimalikke mädanikutekitajaid harilikul kuusel, neid tuvastati koos juurepessu, külmaseene ja verev nahkisega kokku 225 puiduproovist (44,9%). Saadud tulemustest selgus, et enam levinumad mädanikku tekitvad teised seene perekonnad harvendatud aladel mõlemas vanusevahemikus on *Fomitopsis* sp. (9,3%), *Hyphodontia* sp. (5,8%) ja *Onnia* sp. (4,2%) ning harvendamata puistutes *Fomitopsis* sp. (3,2%), *Antrodia* sp. (2,2%) ja *Ganoderma* sp. (1,6%).

Tööst selgus, et 41-80 aastastes kuuse enamusega puistutes ei mõjuta juurepessu esinemist ainult raie teostamine/mitte teostamine, vaid juurepessu levikule avaldavad olulist positiivset mõju veel mulla pH, mulla toiteelemendid (kaalium, magneesium, fosfor), ajalooline maakasutus (endine põllumaa ja põline metsamaa) ning okaspuu- ja lehtpuu osakaal puistus. Edasistes uuringutes oleks vajalik hinnata ka ilmastiku muutuste mõju juuremädanike levikule.

Märksõnad: juurepess (*Heterobasidion* spp.), külmaseen (*Armillaria* spp.), verev nahkis (*Stereum sanguinolentum*), uue põlvkonna sekveneerimine, Illumina MiSeq (2x300 bp)

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Master's Thesis	
Author: Kätlin Piiskop		Specialty: Forest management	
Title: Root and stem rot damages in 41-80 year old Norway spruce (<i>Picea abies</i> (L.) Karst.) stands			
Pages: 57	Figures: 6	Tables: 4	Appendixes: 1
Department:	Chair of Silviculture and Forest Ecology		
Field of research:	Forest pathology		
Supervisors:	Elisabeth Rähn <i>MSc</i> , Tiia Drenkhan <i>PhD</i> , Rein Drenkhan <i>PhD</i>		
Place and date:	Tartu, 2019		
<p>The most important aims of the Master's thesis was to study the proportion of root and stem rot in the age range of 41-60 and 61-80 years in Norway spruce dominated stands, and to analyze the spread of root rot in unmanaged and managed stands and also to identify the species composition of other root rot fungi using next generation sequencing of samples.</p> <p>Increment core samples (N=756) were collected in years of 2016 and 2017 from 63 spruce dominated stands form 63 plots. The samples were evaluated for the occurrence of visual rot (peripheral, central and darkened areas) on increment core samples. Part of increment core samples (N=756), it means 252 samples were analyzed in the laboratory of Forest Pathology and Genetics at the Estonian University of Life Sciences. Species-specific PCR analysis was used to detect <i>Heterobasidion</i> spp., <i>Armillaria</i> spp. and <i>Stereum sanguinolentum</i>. 504 samples were analyzed by next generation sequencing (NGS) method to detect the spread of other potential root and stem rot species in wood samples.</p> <p>The results were indicated that <i>Heterobasidion</i> root rot had infected 241 samples, it means 31.9% of all samples were infected by <i>Heterobasidion</i> spp. Occurrence of <i>Armillaria</i> spp. (1,6%) and <i>Stereum sanguinolentum</i> (4,5%) infection was significantly lower.</p> <p>The effect of thinning to <i>Heterobasidion</i> root rot revealed no significant difference between the unmanaged (33%) and managed (31%) stands ($p>0.16$). There was also no significant effect ($p=0.44$) of <i>Heterobasidion</i> root rot between the younger (41-60 years) and older (61-80 years) age classes. The number of thinning (unmanaged, thinned once, thinned twice) showed statistically significant effect ($p<0.001$) of <i>Heterobasidion</i> root rot in the younger age group (41-60 years), where the proportion of rot damages was lower in</p>			

the twice thinned stands (8%) compared with once thinned (50%) and unmanaged (27%) stands. In the older age group (61-80 years) rot damage was in significantly different ($p < 0.05$) between the number of thinnings.

The combination of the stand site types (*Hepatica*, *Oxalis* and *Aegopodium*) and average diameter of the spruce stump showed that the greater stumps (70-80 cm) were more damaged by *Heterobasidion* root rot in *Hepatica* (50%), followed by *Oxalis* (40%) and *Aegopodium* (30%) site types.

Using next generation sequencing (N=504) was detected other root and stem rot agents with *Heterobasidion* spp., *Armillaria* spp. and *Stereum sanguinolentum* from 225 samples (44,9%). The results showed that most common other rot fungi in thinned stands in both age classes were *Fomitopsis* sp. (9,3%), *Hyphodontia* sp. (5,8%) and *Onnia* sp. (4,2%). In unmanaged stands the most common other rot fungi were *Fomitopsis* sp. (3,2%), *Antrodia* sp. (2,2%) ja *Ganoderma* sp. (1,6%).

The results showed that spruce stands in age 41-80 year old were severely damaged by the *Heterobasidion* root rot, regardless the stand were previously managed or unmanaged. The spread of root rot in dominated Norway spruce stands are significantly affected by soil pH, soil chemical elements (potassium, magnesium, phosphorus), historical land use (formerly arable or primeval forest area) and the proportion of coniferous and deciduous trees in the stand. Further studies should assess the effect of weather conditions (e.g. warm winters) on the spread of root rot.

Keywords: *Heterobasidion* spp., *Armillaria* spp., *Stereum sanguinolentum*, next generation sequencing, Illumina MiSeq (2x300 bp)

SISUKORD

SISSEJUHATUS	8
1. LÜHENDITE JA MÕISTETE SELGITUS	10
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	11
2.1. Harvendusraied kuusikutes ja selle mõju juuremädanike levikule	11
2.2. Juurepess (<i>Heterobasidion</i> spp.).....	13
2.2.1. Üldiseloomustus ja levik	13
2.2.2. Kuuse-juurepess (<i>Heterobasidion parviporum</i>).....	14
2.2.3. Juurepessu tõrjevõimalused.....	15
3.1. Teised olulised mädaniku tekitajad harilikul kuusel.....	16
3.1.1. Külmasseen (<i>Armillaria</i> spp.).....	16
3.1.2. Verev nahkis (<i>Stereum sanguinolentum</i>)	18
4.1. Teised võimalikud juure- ja tüvemädaniku tekitajad.....	19
4.1.1. <i>Phellinus</i> sp.	19
4.1.2. <i>Antrodia</i> sp.	19
4.1.3. <i>Bjerkandera</i> sp.	20
4.1.4. <i>Fomitopsis</i> sp.....	20
4.1.5. <i>Gloeophyllum</i> sp.....	21
4.1.6. <i>Ganoderma</i> sp.	21
4.1.7. <i>Onnia</i> sp.	22
4.1.8. <i>Hyphodontia</i> sp.	22
4.1.9. <i>Climacocystis borealis</i>	22
3. MATERJAL JA METOODIKA.....	24
3.1. Välitööd	25
3.1.1. Juurdekasvuproovide kogumine.....	25
3.1.2. Mullaproovide kogumine	25
3.2. Laboritööd.....	26
3.2.1. Puiduproovide analüüs	26
3.2.2. Mullaproovide keemiline analüüs	27
3.3. Molekulaaranalüüs.....	27
3.3.1. DNA eraldamine	27
3.3.2. Uue põlvkonna sekveneerimine (NGS) ja bioinformaatiline analüüs.....	28
3.3.3. Liigispetsiifiline PCR (polümeraasahelreaktsioon) analüüs	28
3.3.4. Geelelektrofrees	31
3.4. Statistiline analüüs	32
4. TULEMUSED	34
4.1. Visuaalne mädaniku esinemise hinnang kuusikutes	34
4.2. Juurepessu esinemise osakaal	35
4.3. Puistu vanuse, harvendusraie ja maakasutuse mõju juurepessu osakaalule	36
4.3.1. Harvendusraie mõju juurepessu osakaalule	37
4.3.2. Eelneva maakasutuse mõju juurepessu osakaalule	39

4.4. Kuuse enamusega puistute diameetri ja kasvukohatüüpide mõju juurepessu levikule	40
4.5. Teised võimalikud mädaniku tekitajad	42
5. ARUTELU	44
KOKKUVÕTE	48
KASUTATUD KIRJANDUS	50
LISAD	54
Lisa 1. Analüüsitud kuuse enamusega puistud vanusevahemikus 41-80 aastat	55

SISSEJUHATUS

Käesolev sajak on toonud kaasa suuri muutuseid nii kliimas kui ka metsade majandamises. Muutunud on metsade majandamise struktuur, intensiivsus ja praktikad. Muutused said alguse taasiseseisvumise (1991) perioodil, kui Eesti Vabariik tagastas õigusvastaselt võõrandatud maad eraomanikele.

Eestis on metsaga kaetud 51,4 % maismaast, millest hariliku kuuse (*Picea abies*) enamusega puistuid esineb 18,8% ulatuses, moodustades 19,7% kogu meie metsade tagavarast. Kuusikute vanuselise jagunemise alusel on Eestis 41-60 aastaseid kuuse puistusi 23,2% ning 61-80 aastaseid 18,4 % (Aastaraamat...2018).

Enamjaolt valitseb metsaökosüsteemides tasakaal, kuid kui võimendatakse ühe liigi produktiivsuse tõstmiseks (harvendusraiate tulemusel) loodud tingimusi, siis tulemus võib olla negatiivse mõjuga, mis väljendub metsas juuremädanike leviku näol (Asiegbu *et al.* 2005).

Olulisemad juure- ja tüvemädaniku tekitajad hariliku kuuse enamusega puistutes on juurepess (*Heterobasidion* spp.), külmaseen (*Armillaria* spp.) ja verev nahkis (*Stereum sanguinolentum*). Verev nahkis erineb juurepessust ja külmaseenest leviku iseärasuse poolest, kuna kahjustab puid vaid tüvehaavandite kaudu (Hanso, Hanso 1999a; Drenkhan *et al.* 2014). Liikide leviku strateegia on erinev: juurepess on suuteline levima ja nakatama puid plusskraadide juures, kuid verev nahkis on võimeline ka miinuskraadidega haavandite kaudu puid nakatama (Vasiliauskas, Stenlid, 1998; Hanso, Hanso 1999a).

Enim on juuremädanike poolt kahjustatud kuusikud, mis kasvavad viljakatel rähk- ja jääkkarbonaatsetel muldadel (jänesekapsa, sinilille ja naadi kasvukohatüübid). Mõnevõrra väiksem on kahjustuste osakaal puistutes, kus peale kuuse esineb ka lehtpuuliike, mis muudab patogeeni leviku peremeestaimeni keerulisemaks (Hanso, Hanso 1999b).

Olulist mõju juuremädanike levikule põhjustab harvendusraiate teostamine, mille tulemusel tekivad tüvevigastused ja kännud, mis loovad ideaalsed tingimused juuremädanike edasiseks levikuks (Piri, Korhonen 2007).

Käesoleva töö teema on väga aktuaalne, kuna eelnevalt tehtud juuremädanike uuringud Eestis (Drenkhan 2014) on näidanud kuuskede halba tervislikku seisundit, mistõttu on oluline hinnata kuuse enamusega puistutes juuremädanike kahjustusi.

Magistritöö eesmärkideks on uurida: (1) juure- ja tüvemädanike kahjustuste ulatust puistutes vanusevahemikes 41-60 ja 61-80 aastat; (2) juuremädanike levikut harvendatud ja harvendamata puistutes ning teisi mõjufaktoreid kuusikute sanitaarsele seisundile; (3) välja selgitada teiste olulisemate mädanikke tekitavate seente liigiline koosseis kasutades uue põlvkonna sekveneerimist.

Suured tänusõnad juhendajatele Elisabeth Rähn'ile, Tiia Drenkhan'ile ja Rein Drenkhan'ile abistavate nõuannete ja kannatlikkuse eest ning võimaluse osaleda RMK ühisprojektis "Kuusikute raieaja ja raieviiside mõju patogeenide levikule ja arvukusele ning puistu elurikkusele viljakates kasvukohatüüpides" (01.09.2016-31.08.2019). Soovin tänada ka Kalev Adamson'i abistamise eest statistilise andmeanalüüsi tegemisel ning näpunäidete eest laboratoorsete tööde teostamisel Eesti Maaülikooli metsapatoloogia ja -geneetika laboris.

1. LÜHENDITE JA MÕISTETE SELGITUS

1. **DNA** – desoksüribonukleiinhape on elusorganismides pärilikku informatsiooni säilitav aine.
2. **PCR** – polümeraas ahelreaktsioon on meetod DNA amplifitseerimiseks ehk kahekordistamiseks. PCR meetod võimaldab luua väga väikesest DNA lõigust uusi koopiaid.
3. **Liigispetsiifiline PCR** – liigispetsiifiline polümeraasahelreaktsioon võimaldab väikese DNA lõigu abil määrata uuritava seene täpset liiki.
4. **Liigispetsiifiline praimer** – lühike liigispetsiifiline nukleotiididejärjestus, mille alusel initseeritakse DNA süntees polümeraasahelreaktsiooni käigus.
5. **Denaturatsioon** – biopolümeeride (peamiselt valkude omaduste) muutumist temperatuuri, rõhu ja muude tingimuste kaasabil.
6. **Uue põlvkonna sekveneerimine (NGS)** – on DNA molekuli primaarse struktuuri nukleotiidide järjestuse määramine, mis võimaldab järjestada nii väikeseid DNA fragmente kui ka kogu genoomi.
7. **OTU** – Taksonoomiline üksus ehk organismi liigitus.
8. **Takson** – ehk taksonoomiline üksus (liik, perekond, sugukond, selts, hõimkond).
9. **Amplifitseerimine** – kahekordistamine
10. **Risomorf** – seeneniitidest koosnev lihtne või hargnev koorja kihiga kaetud nõorjas moodustis.
11. **Hümenofoor** – eoslavakandja seene viljakehal.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1. Harvendusraied kuusikutes ja selle mõju juuremädanike levikule

Harvendusraie eesmärgiks on parandada puistu kvaliteeti, reguleerida metsa koosseisu ja tihedust, et seeläbi parandada elujõulisemate puude toiteainete- ja kasvu võimalusi. Harvendusraiega tagame lõppraie korral parema puidu sortimentatsiooni (Kerr, Haufe 2011).

Harvendusraieid teostatakse puistutes, mille keskmine diameeter ületab kaheksat sentimeetrit. Tehtud harvendusraie tulemusel ei tohi puistu esimese rinde rinnaspindala olla väiksem metsa majandamise eeskirjas välja toodud alammäärast (Metsa majandamise eeskiri 2007). Hariliku kuuse enamusega puistute harvendusraiate osakaal oli 2013. aastal riigi metsades 536 000 m³ (Aastaraamat...2016). Ebamõistliku harvendusraiate teostamise tulemusel võivad saada loodusliku tekkega segapuistutest monokultuursed puistud, mis on vastuvõtlikumad juuremädanikele. Juuremädanike leviku üheks vältimise viisiks on metsade majandamine segapuistutena (Karu 1953).

Eestis on enim levinud juuremädaniku tekitaja juurepess (*Heterobasidion* spp.), tekitades okaspuudel, peamiselt harilikul kuusel (*Picea abies*) tüve- ja juuremädanikku. Mida intensiivsem on raie puistus, seda suurem on juurepessu leviku tõenäosus (Hanso, Õunap 2016). Juurepessuga koos esineb juure- ja tüvemädanikku tekitav seen verev nahkis (*Stereum sanguinolentum*), mis kahjustab harilikku kuuske enim raiete käigus tekkinud tüve- ja juurevigastuste kaudu (Hanso, Hanso 1999a), aga ka muude vigastuste kaudu, näiteks põdra poolt kooritud kuused.

Harvendusraie on oluline faktor juuremädanike leviku intensiivistumisel, kuna raie järgselt tekivad seene eoste levikuks kännud ning raiemasinate kasutamisel võivad tekkida puudele haavandid, mille kaudu puud nakatuvad erinevate mädanikku tekitavate seentega (Korhonen *et al.* 1998; Piri, Korhonen 2007).

Skandinaavias on tehtud mitmeid teadusuuringuid, et selgitada harvendusraiate mõju juurepessu levikule. Norras ja Rootsis viidi läbi uuring harvendusraiate mõjust noortele kuuse puistutele. Tulemustest selgus, et juurepessu osakaal oli kõrgem just vanemates puistutes, mille põhjuseks võib olla vanemate puude tugevamad juurekontaktid patogeeni

levimiseks (Hanso, Hanso 1999b). Rootsis viidi läbi uuring, kus hinnati juuremädanike osakaalu peale esimest harvendusraiet. Saadud tulemused näitasid, et juurepess on hariliku kuuse puistutes kõige agressiivseim seenpatogeen (Rönnberg *et al.* 2007).

Eestis on uurinud harvendusraite mõju juurepessu levikule hariliku kuuse puistutes Lembit Muiste, rajas Lõuna-Eestisse põllumaale istutatud kuusikusse viis harvendusraie katseala, kus eelnevalt juurepessu ei esinenud (Muiste 1965). Uuritavate kuuskede vanus jäi vahemikku 10-18 aastat. Kõikidel viiel alal tehti harvendusraie suvisel perioodil, kasutades erinevaid raieviise. Hilisema uuringu L. Muiste katsealadel teostasid Märt ja Silja Hanso, mille käigus saadud tulemused näitasid, et harvendusraie parandab alles jäänud puude valguse- ja toitainete tingimusi, millega suurenes puistu juurdekasv. Puude kiirem kasv aga vähendab vastupanuvõimet haigustekitajate kaitseks, kuna kaitseainete sünteesiks mõeldud varuaine tarvitatakse ära intensiivseks puu kasvuks. Saadud tulemused näitasid, et vähem harvendatud puistutes oli juurepessu leviku osakaal madalam, kui intensiivselt harvendatud puistutes (Muiste 1965; Hanso, Hanso 1999b).

Uuritud on harvendusraiate mõju juurepessu levikule erinevatel aastaaegadel (talv, kevad, suvi) 31-57 aastastes hariliku kuuse puistutes. Tulemustest selgus, et nii talvel kui suvel raiutud puistud on juurepessu poolt nakatunud. Juurepessu nakkust ei tuvastatud aladelt, kus oli teostatud raie varakevadel, kuid oluline on teada, et antud aladel ei olnud eelnevalt raieid teostatud. Nakatunud puid oli vähem suvisel (keskmiselt 20%) harvendusraiega aladel, võrreldes talvisel perioodil (keskmiselt 28%) teostatud raietega. Talviste raiete kõrge juurepessu esinemise põhjuseks võib olla eoste võime levida nakkusohtlikule alale kaugematelt ning jääda ellu kuni plusskraadide saabumiseni (Hanso, Hanso 1999b; Drenkhan 2014).

2.2. Juurepess (*Heterobasidion* spp.)

2.2.1. Üldiseloomustus ja levik

Juurepess (*Heterobasidion* spp.) on üks olulisemaid juure- ja tüvemädanikku tekitav seenpatogeen, mille mitmeaastased viljakehad on liibuvad, kübarjad, kõvad ja varieeruva suurusega (Asiegbu *et al.* 2005; Niemelä 2008). Tegemist on parasvöötme ja boreaalsetes metsades leviva patogeeniga (Drenkhan 2006). Suurt mõju avaldab juurepess just okaspuu (männikud, kuusikud) puhtpuistutele, kus pideva majandustegevuse käigus on tekkinud kännud ning tihe ühendus juurekontaktide kaudu soodustab haiguse edasist levikut tervete puudeni (Piri, Korhonen 2008). Seeläbi suureneb haiguskollete osakaal, mis on tõsiseks ohuks puistu tervislikule seisundile (Hanso, Öunap 2016).

Juurepessu varjatud avaldumisviisi tõttu on seda raske puistus koheselt märgata. Väliste tunnuste põhjal on võimalik omavahel eristada männi- ja kuuse-juurepessu viljakehi, kus erinevus seisneb hümenofooril esinevate pooride tiheduses (männil- 4,4-12,2 poori/mm²; kuusel- 8,5-17,6 poori/mm²) ning viljakehi katvate karvade pikkuses ja tiheduses (Korhonen 1978; Niemelä 2008), kuid tänapäeval kasutatakse liikide täpseks tuvastamiseks molekulaarseid meetodeid.

Juurepessu kahjustuste osakaal on kõrge just intensiivselt majandatud metsades. Levikut mõjutab puude risosfääris valitsevad tingimused (mulla temperatuur, veerežiim, mükoriisa). Haigustekitaja mütseel levib temperatuurivahemikus 0-34 °C, kuid kõige soodsamad tingimused selleks on temperatuuril 22-28 °C. Keskmine mullatemperatuur 5-20 cm sügavusel ei tõuse isegi suvekuudel nii kõrgele ning seetõttu on seene vegetatiivne levimine juurekontaktide kaudu tõhusam parasniisketes ja hästi soojenevates muldades. Levik on soodustatud ka liivmuldadel, orgaanilise aine vähesuse ja kõrgema happesuse tingimustes (Hanso, Hanso 1999b).

Juurepessu poolt on enim ohustatud puistud, mis on rajatud eelnevalt nakatunud aladele ilma enamuspuuliiki muutmata (Hanso, Hanso 1999b). Samuti on kõrge juurepessu nakkus endisele põllumaale rajatud okaspuu kultuurides, kuna antud aladel puuduvad metsamullale iseloomulikud mikroorganismid, et takistada juurepessu levimist (Swedjemark, Stenlid 1993), teisalt võib lähedal asuva nakatunud metsa puudumine just juurepessu nakkust aidata vältida. Suur oht tekib just tihedates liigivaestes puistutes, kus on tehtud harvendusraieid, mille käigus tekkinud kännud nakatuvad juurepessu eostega.

Juurepessu leviku ärahoidmiseks või piiramiseks on üks võimalikke lahendusi segapuistute loomine, et minimeerida puuliikide vahelisi juurekontakte patogeeni paremaks levikuks (Hanso, Hanso 1999b).

Metsakultuuri algtihedus on oluline aspekt juurepessu leviku seisukohalt. Mida tihedam on puistu, seda rohkem on vaja teha harvendusraieid, mille käigus tekkinud kännud soodustavad juurepessu aktiivset levikut (Hanso, Hanso 1999b). Kännud, mille diameeter on alla 3 cm nakatuvad juurepessu tunduvalt harvemini, kui suurema diameetriga kännud (Hanso, Hanso 1999b). Põhjuseks väiksem eoste kinnitumise ala ning puuduv juurekontakt teiste puudega. Patogeeni leviku tõttu jääb majandusmetsadest saamata kuni 30% tulust. Euroopas ulatuvad juurepessust tekitatud kahjud ligi 800 miljoni euronni aastas (Hanso, Hanso 1999b; Asiegbu *et al.* 2005; Hanso, Õunap 2016).

2.2.2. Kuuse-juurepess (*Heterobasidion parviporum*)

Kuuse-juurepess on enim levinud juure- ja tüvemädaniku haigus harilikul kuusel, olles laialt levinud Põhja-Euroopas ning Kesk- ja Lõuna Euroopas. Antud patogeenile on omane mitmeaastane liibuv, poolliibuv või kübarjas varieeruva suurusega viltjas, valkjast kuni helepruuni värvusega viljakeha (Joonis 1) (Niemelä 2008).

Kuuse-juurepess ohustab enamasti harilikku kuuske, nulgu (*Abies* spp.), lehist (*Larix* spp.) ja mändi (*Pinus* spp.), mis kasvavad viljakates kasvukohatüüpides (jänesekapsa-, sinilille-, naadi- ja kastikuloo). Norras on tuvastatud kuuse-juurepessu ka harilikult kanarbikult (*Calluna vulgaris*) ja mustikalt (*Vaccinium myrtillus*) (Hanso, Hanso 1999a; Hanso, Õunap 2016). Leedus on juurepessu viljakehi tuvastatud ka väliste tunnuste poolest terveks hinnatud kuuskedelt (Vasiliauskas, Stenlid 1998).

Kuuse-juurepess põhjustab algfaasis puidu värvimuutust helekollakast pruunini. Jämedamates juurtes kahjustab kuuse-juurepess vaid tsentraalosa, kuid peenjuuri kogu juure ulatuses, millele järgneb puu ja juurte lagunemine. Juurte kaudu liigub haigus tüve keskmisesse ossa ning võib tõusta puu tüves kuni 12 m kõrgusele (Asiegbu *et al.* 2005; Hanso, Õunap 2016).

Nakatunud kuuskedel ilmnevad küll välised haigustunnused, kuid tänu pidevalt uutele kasvavatele peenjuurtele on kuused võimelised aastaid haigusega koos elama (Redfern 1982). Mänd aga seevastu pole võimeline endale uusi peenjuuri kasvatama ning

tulemuseks on puu kiire kuivamine. Kõige kiiremini surevad juurepessu poolt haigestunud kadakad, mistõttu saab neid kasutada indikaatorliigina juurepessu nakkuse tuvastamiseks (Drenkhan 2011).



Joonis 1. Kuuse-juurepessu viljakeha hariliku kuuse juurel (Foto: Rein Drenkhan).

2.2.3. Juurepessu tõrjevõimalused

Juurepessu leviku piiramiseks on oluline tegeleda patogeeni leviku ennetamisega, kuna haigustekitajast puistus pole võimalik vabaneda (Hanso, Õunap 2016). Tänapäeval on kasutusel keemilistest vahenditest karbamiid ning bioloogilistest vahenditest Rotstop (Holdenrieder, Greig 1998). Rotstop® on pulber, mis sisaldab antagonistliku seene, hiidkooriku (*Phlebiopsis gigantea* Jülich) eoseid, pulbrist tehakse vesilahus kändude pritsimiseks. Eestis on lubatud biopreparaadi Rotstopi kasutamine, mis registreeriti 2004. aastal (Drenkhan 2006).

Hiidkoorik on puidulagundaja ning ei ohusta seetõttu terveid puid, kuna kasutab oma elutegevuseks surnud puitmaterjali (Drenkhan 2011). Hiidkooriku viljakehad on liibuvad,

valkjashallid või kahvatu-kollased ning täiskasvanult enamasti omavahel liitunud (Drenkhan 2011).

Karbamiidi (urea) vesilahus on lõhnatu aine, mis sisaldab süsiniku, hapniku, lämmastiku ja vesiniku ühendeid. Antud keemilist preparaati kasutati peamiselt Rootsis, kus ligi kolmandik kände töödeldi karbamiidiga (Thor 2003; Hanso, Õunap 2016).

Juurepessu leviku piiramiseks ja ära hoidmiseks on andnud kõige paremaid tulemusi just Rotstop'ga kändude töötlemine. Rotstop preparaati kasutatakse kuuse ja männi enamusega lage- ja harvendusraie lankidel (Berglund 2005).

Skandinaavias läbi viidud välikatsete tulemused näitasid biopreparaadi (hiidkooriku) efektiivsust vastavalt tehtud kolmel katsel - 90, 93 ja 99%. Antud tulemuste põhjal saab öelda, et hiidkoorik on võimeline värskel kännul takistama juurepessu arengut, kasvades patogeenist üle ja seeläbi tõrjudes teda kännust välja (Thor 1997; Drenkhan 2011).

Mõistlik on ka eelneva metsapõlvkonna kände töödelda Rotstopiga ning eelistada talviseid raieid, kuna miinuskraadide juures pole juurepessu eosed võimelised levima (Drenkhan 2011; Hanso, Õunap 2016).

3.1. Teised olulised mädaniku tekitajad harilikul kuusel

3.1.1. Külmaseen (*Armillaria* spp.)

Külmaseen on peale juurepessu teine oluline juuremädaniku tekitaja Euroopas ja Eestis, mis tekitab puudel juure- ja südame- mädanikku, kahjustades erinevas vanuses okas- ja lehtpuid. Külmaseene nakkuse korral pidurdub puu juurdekasv, võib esineda vaigujooksu, halveneb puidu kvaliteet ning esineb puude kuivamist (Hanso, Hanso 1999a; Voolmaa, Õunap 2000; Prospero 2003; Guillaumin, Legrand 2013).

Külmaseen levib risomorfide abil mullas ja metsakõdus sadade meetrite kaugusele, kasutades kändusid toitebaasidena. Risomorfid kasvavad pikki puude juuri kahjustades puid juurte kaudu. Nakatunud puude koore all on näha patogeenile omaseid risomorfe (Hanso, Hanso 1999a; Prospero 2003). Peale juurte nakatumist aeglustub puu võrsete kasv, esinevad muutused lehtede ja okaste värvuses, millele järgneb võra hävimine, puu suremine ning hilises haigusstaadiumis vaigujooks tüvel (Prospero 2003; Tjoelker *et al.* 2007).

Külmaseen on sekundaarne patogeen, mistõttu ta iseseisvalt puid nakatada ei suuda. Peamiselt nakatuvad puud, mis on eelnevalt mõne patogeeni poolt juba haigestunud. Külmaseen on võimeline tootma mitmeid erinevaid antibiootikume ja sekundaarseid mürke bakterite ja seente vastu (Tarus *et al.* 2003; Hanso, Drenkhan 2007).

Eestis esineb teadaolevalt viite erinevat külmaseene liiki: tõmmu külmaseen (*Armillaria ostoyae*), põhja-külmaseen (*A. borealis*), tutt-külmaseen (*A. cepistipes*), tamme-külmaseen (*A. tabescens*) ja mugul-külmaseen (*A. gallica*). Külmaseene liikide arenguks on soodsad positiivsed temperatuurid vahemikus +10 °C kuni +31 °C (Hanso, Hanso 1999a; Sturrock *et al.* 2011). Külmaseene perekonna liigid võivad põhjustada elavatel puudel kasvu pidurdust enam kui 58% ulatuses. Samas aga Kanadas uuritud musta kuuse (*Picea mariana*) metsades ei täheldatud kasvu erinevusi haigete ja tervete puude vahel (Cruickshank 2011; Westwood *et al.* 2011). *Armillaria* perekonna liikide määramine võib olla mõne liigi puhul keerukas, kuid oluline on siiski teada majanduslikust seisukohast, kas tegu on agressiivse või pigem saprotroofse liigiga, et otsustada tõrje olulisuse üle (Lamour, Jeger 2000).

Tõmmu külmaseen (*A. ostoyae*) on levinud Lõuna-Rootsis, Lõuna-Soomes, Taanis, Lääne-Euroopas ja Põhja-Ameerikas (Marxmüller, 1982; Whitney, 1995), olles ohtlik juurepatogeen toitaine- ja kuivadel kasvukohtadel kasvavates noortes männikutes, tekitades südame- ja mädanikke. Tõmmu külmaseen on antud perekonna liikidest kõige ohtlikum liik harilikule kuusele, tekitades juure- ja mädanikke (Hanso, Hanso 1999a). Põhja-külmaseen (*A. borealis*) on kõige põhjapoolsema levikuga külmaseeneliik. Antud seen on nõrk patogeen, mis tekitab juure- ja tüvemädanikke enamasti okaspuudele, kuid on leitud ka mõndadelt lehtpuudelt (Roll-Hansen, Roll-Hansen 1995; Hanso, Hanso 1999a).

Tutt-, tamme- ja mugul-külmaseen ei ole Eestis patogeensed liigid, mistõttu nad on väheolulised seened majanduslikust seisukohast meie metsades (Hanso, Hanso 1999a).

Külmaseene tõrjeks pole leitud tõhusat võimalust. Patogeeni tõrjeks on proovitud mitmeid erinevaid fungitsiide ja bioloogilisi vahendeid, kuid tegemist ei ole olnud kuigi efektiivsete lahendustega. Kemikaalid pole võimelised tungima külmaseene mütseelini ja kaugele ulatuvate risomorfideni (West 2000).

Läbi on viidud katseid Fundazol'i ja mitmete teiste fungitsiididega, kuid antud tõrje tulemusel pidurdus patogeeni kasv vaid ajutiselt ning kemikaalide lahustumisel jätkasid risomorfid oma edasist arengut (West 2000).

Bioloogilise tõrje puhul on oluline pikaajalised, samas aga keskkonnasäästlikud tõrjevõimalused (West 2000). Külmasene nakkuse riski vähendab kändude juurimine ja põletamine enne uue metsapõlvkonna istutamist (Guillaumin, Legrand 2013).

3.1.2. Verev nahkis (*Stereum sanguinolentum*)

Verev nahkis (*S. Sanguinolentum*) on oluline tüve- ja juuremädanike tekitaja harilikul kuusel, nakatades puid tüve- ja juurevigastuste kaudu (Roll-Hansen, Roll-Hansen 1995). Antud seeneliik on tekitanud suuri kahjusid kuuse puistutes Norras, Kesk-Rootsis, Leedus ja Soomes. Verev nahkis on tavaline seeneliik ka meie metsades (Hanso, Hanso 1999a).

Verev nahkis levib raie käigus tekkinud tüve-, juure- ja juurekaela vigastuste kaudu, põhjustades haavandites vaigujooksu, võras okaste värvuse muutust, puidu kvaliteedi halvenemist ning puude kuivamist. Kasvavat kuuske on võimeline verev nahkis nakatama juba ühe aasta jooksul peale kahjustuse tekkimist. Kergemini nakatuvad antud patogeeni poolt vigastuste kaudu, mis on tekkinud puudele vegetatsioonivälisel perioodil (Hubert 1935; Vasiliauskas, Stenlid 1998; Hanso, Hanso 1999a).

Leedus asustab verev nahkis keskmiselt 20,3 % kuusele tekkinud haavanditest, olles seega üks ohtlikum haavaparasit, mille keskmiseks levimiskiiruseks tüves on 37 cm/aastas (Vasiliauskas 1998; Hanso, Hanso 1999a).

Patogeeni olemasolu on kasvaval puul raske tuvastada, kuna viljakehad tekivad enamasti ainult puu juurtele või tüvele. Viljakehad on valdavalt resupinaatsed ehk liibuvad, nahkjad ning asetsevad tihedalt vastu puu haavandit (Hubert 1935). Verev nahkisest nakatunud puudel esineb puidus värvimuutus (heledast hallikaspruunist tumeda pruunini), mille tulemusel kahjustub esmalt südamikupuit ning liigub edasi koorealusesse puidukihti. Kahjustunud puidu osa muutub rabedaks ja pehmeks, meenutades õhulist käsna (Hubert 1935).

Eriti ohtlikuks teeb verev nahkise võime areneda vegetatiivselt talvisel raieperioodil, levikuks sobilik temperatuurivahemik on -8,3°C kuni +5°C kraadi. Kuid seevastu suvisel perioodil on verev nahkise levik piiratud, mille põhjuseks võib olla nõrk konkurentsivõime teiste mikroorganismide suhtes (Kallio 1976; Hanso, Hanso 1999a).

4.1. Teised võimalikud juure- ja tüvemädaniku tekitajad

Töö tulemusena saadi uue põlvkonna sekveneerimise (NGS) andmestikust ka teisi võimalikke mädanikku tekitavaid liike (tabel 4) perekonna tasemel. Käesolevas peatükis on toodud lühiülevaade olulisematest seeneliikidest perekonna tasemel, samuti on nimetatud igast seene perekonnast Eestis enamlevinud liigid.

4.1.1. *Phellinus* sp.

Taelikute (*Phellinus* sp.) viljakehad on mitmeaastased, pruuni värvusega, tugevad ja kõvad, tekitades puidus valgemädanikku. Viljakeha ülapind on noorena pruun ning vanemas eas hallika värvusega. Kübaraga liikidel on ülapind enamasti mustjas ja lõhestunud. Liigid on enamasti kergesti äratuntavad peremeespuu ja nende välimuse järgi. Taelikud esinevad nii okaspuudel kui ka lehtpuudel. Eestis on taelikute perekonnast enim levinumaid: kuusetaelik (*Phellinus chrysoloma*), haavataelik (*P. tremulae*), pajutaelik (*P. conchatus*), tuletaelik (*P. igniarius*), sile taelik (*P. laevigatus*), männitaelik (*P. pini*), punkttaelik (*P. punctatus*) ja ploomitaelik (*P. tuberculosus*). Nimetatud seeneliigid on meie metsades laialdaselt levinud, olles olulised mädaniku tekitajad kändudel ja tüügastel, kui ka kasvavate puude tüvedel (Niemelä 2008; e-Elurikkus 2019).

Harilikku kuuske ohustab enim kuusetaelik, tekitades puidus valget korrosioonimädanikku. Antud patogeeni viljakehad esinevad nakatunud puude oksatüügastel ning surnud tüvedel suurte kogumikena. Kuusetaelik on põlismetsade indikaatorliik (Larsson *et al.* 2006; Niemelä 2008).

4.1.2. *Antrodia* sp.

Korgikute (*Antrodia* sp.) viljakehad on valkjad, tugevad, enamasti liibuvad ühe- või mitmeaastased (Lõhmus *et al.* 2005), tekitades pruunmädanikku okas- ja lehtpuude lamatüvedel ja kändudel. Mitmeaastased viljakehad on lühiajalised aga üheaastased võivad talvituda ja anda suurema osa eostest varakevadel (Niemelä 2008).

Antrodia sp. on heterogeense päritoluga perekond, mis jaguneb väiksemateks seenerühmadeks. Eestis on esindatud antud perekonnast 19 liiki, mis kasvavad okas- kui ka lehtpuudel. Enim levinud esindajad antud perekonnas on näätskorgik (*Antrodia sinuosa*), kollakas korgik (*A. xantha*) ja kuusekorgik (*A. serialis*), olles leviku poolest sagedased kogu Eestis (Niemelä 2008; e-Elurikkus 2019).

4.1.3. *Bjerkandera* sp.

Suitsikute (*Bjerkandera* sp.) viljakehad on üheaastased kübarja kujuga, tekitades nii elus- kui ka surnud puudele valgemädanikku. Antud perekonda kuulub kaks liiki – harilik suitsik (*Bjerkandera adusta*) ja pruun suitsik (*B. fumosa*), mis ohustavad parkide ilupõõsaid ja teisi lehtpuid (vaher, kask, jalakas jt.). Eestis on enim levinud ja arvukas liik harilik suitsik (Niemelä 2008; e-Elurikkus 2019).

4.1.4. *Fomitopsis* sp.

Kännupessudele (*Fomitopsis* sp.) on omased mitmeaastased kübaratega viljakehad, mis noores eas lamatüvede all kasvades on paksud ja liibuvad ning hiljem arenevad poollibuvateks mütsjateks viljakehadeks. Viljakehad esinevad okas- ja lehtpuude surnud püstistel ja lamatüvedel, tekitades puidus kiiresti levivat pruunmädanikku. Eestis on levinud kännupess (*Fomitopsis pinicola*) ja roosa pess (*F. rosea*). Kännupessu on levinud üle kogu Eesti, esinedes ka kasvavatel kuuse ja pärna tüvedel, mistõttu on antud seen oluline mädaniku tekitaja (Niemelä 2008; e-Elurikkus 2019).

Kännupessu mitmeaastane viljakeha on kiilukujuline või lame. Värvus varieerub kreemikasvalgest oranži ja mustani, sõltuvalt viljakeha vanusest ja kasvukiirusest. Roosa pessule on aga omane kühmjas või kiilukujuline viljakeha, mille ülapinna värvus varieerub heleroosast pruunini või mustani, sõltuvalt vanusest. Alapind on lillakas- või roosakaspunane. Eestis esineb harva, peamiselt kuusel aga ka teistel okaspuudel ja lehtpuudel (Niemelä 2008).

4.1.5. *Gloeophyllum* sp.

Kõrbikud (*Gloeophyllum* sp.) on ühe- või mitmeaastased viljakehad tekitades pruunmädanikku lamatüvedel ja puitrajatistel. Kõrbikute perekonnast on Eestist leitud nelja liiki: kuusekõrbik (*Gloeophyllum abietinum*), palgikõrbik (*G. trabeum*), pruun kõrbik (*G. sepiarium*) ja lõhnav kõrbik (*G. odoratum*), mis kõik on võimelised kahjustama kuusepuidu kvaliteeti (Niemelä 2008). Kõrbikulised on Eestis suhteliselt laialt levinud (e-Elurikkus 2019).

4.1.6. *Ganoderma* sp.

Vaabikute (*Ganoderma* sp.) viljakehad on vormirohked ning nende tavalisemad liigid elavad troopikas. Eestis esineb kahte vaabikute liiki: Jänesevaabik (*Ganoderma applanatum*) ja lakkvaabik (*G. lucidum*), mis on kergesti ka üksteisest eristatavad. Perekonna tunnuseks on suured näsalisena paistva pinnaga pruunid eosed, mis on nähtavad vaid mikroskoobi all. Vaabikud tekitavad enamasti lehtpuu, kuid mõnikord ka okaspuu puidus valgemädanikku (Niemelä 2008).

Jänesevaabikule on omased mitmeaastased, kübarjad, kiilukujulised või lamedad viljakehad, väga varieeruvate suurustega. Noored viljakehad on algselt pealt valged, sitked ja seest punapruunid. Hiljem katab viljakeha pinda tuhm nahkpruun või pruunikashall kõva koorik, mis on sageli kaetud kakaopruuni eospulbriga. Jänesevaabik esineb peamiselt kase, haava, sanglepa lamavatel või surnud püstistel tüvedel, väga harva on leitud ka kuuselt või elustüvedelt. Eesti väga sagedane liik, peaaegu kõigis metsatüüpides (Niemelä 2008; Hanso, Hanso 1999a).

Lakkvaabik on üheaastane, külgmise või keskmise jalaga, keskmise kuni suure viljakehaga. Viljakeha ülapind on lainjas läikiv oranžikaspunane, mis on sageli kaetud kakaopruuni eospulbriga. Lakkvaabik esineb peamiselt niisketes lehtmetsades, kahjustades puude juuri, harvem kuuse- ja männi kändudel ning lamatüvedel, tekitades pehmet valgemädanikku. Lakkvaabikut esineb Eestis väga harva ja see on kaitsealune liik (Niemelä 2008; Hanso, Hanso 1999a).

4.1.7. *Onnia* sp.

Jänesepässi (*Onnia* sp.) viljakehad on sametise ülapinna ja pruuni värvusega, kinnitudes puu juurtele ja tekitades valgemädanikku. Perekond *Onnia* sp. liigid on okaspuudele patogeensed. Levinud on kaks jänesepässi liiki: jalg-jänespäss (*Onnia tomentosa*) ja kuuse-jänespäss (*O. Leporina*) (Niemelä 2008).

Kuuse-jänesepässile on omane üheaastane, kübarjas, riuli- või lehvikukujuline kogumikes kasvav viljakeha. Eestis esineb suhteliselt harva, kasvades loo-, palu-, laane- ja salumetsades elusatel tüvedel ja tüügastel (Niemelä 2008).

Jalg-jänesepäss on tuntud kui ka viltjas pässik, mille üheaastased viljakehad on ümara kübaraga või rosetjad. Ülapind on lame kaneelipruun või ookerkollane. Täiskasvanult on kübara serv jäik, terav, kollane. Eestis esineb antud seent vähearvukalt, kasvades metsades kuuse juurtel või puude ligiduses (Niemelä 2008).

4.1.8. *Hyphodontia* sp.

Suurem osa näsanahkise (*Hyphodontia* sp.) liikidest on näsalise või hammasjas-ogalise pinnaga. Hüüfisüsteem on antud seentel monomiitne ehk ühetüübiline, koosnedes õhukestest- või paksukestalistest harunevatest seeneniitidest, mis annavad viljakehale pehme konsistentsi (Niemelä 2008).

Eestis on leitud nelja liiki näsanahkiste perekonnast: valgepoorne- (*Hyphodontia latitans*), kollapoorne- (*H. flavipora*), veider- (*H. paradoxa*) ja narmaspoorne näsanahkis (*H. radula*). Antud seened on Eestis haruldased ja vähese leviku ulatusega (Niemelä 2008).

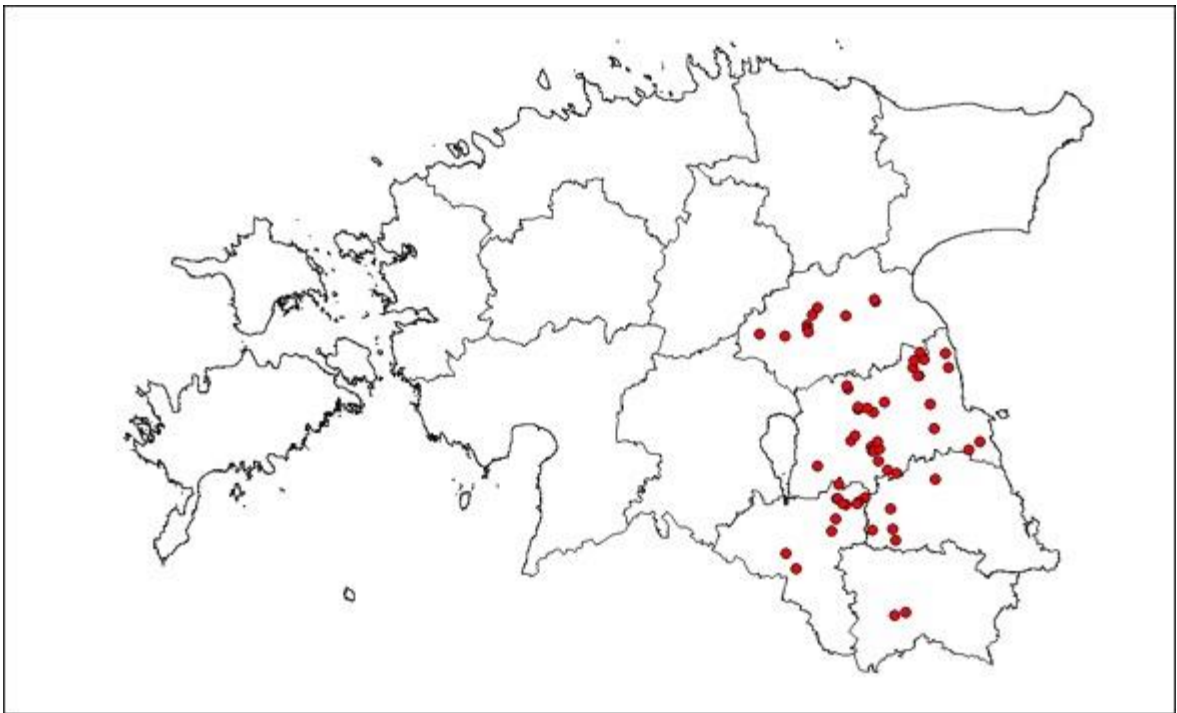
4.1.9. *Climacocystis borealis*

Põhjatorikul (*Climacocystis borealis*) on valge, väga kiulise struktuuriga, üheaastane, kübarjas viljakeha, mis tekitab okaspuudele kiulist vesist valgemädanikku. Viljakehad kasvavad enamasti mitmekümne kübaralistes rühmades. Antud seen kahjustab enamasti kuuse kände, tüükaid ja võib esineda ka elusatel puudel (Niemelä 2008).

Põhjatorik põhjustab juuresüsteemist alguse saavat südamemädanikku ning mädanik võib tõusta tüves isegi kuni 2 meetri kõrguseni. Nakatumine saab alguse tüve- ja juurevigastustest. Esineb peamiselt surnud puude tüükaosas ning kuuse kändudel. Elusaid puid kahjustab harva. Eestis tavaline liik, olles indikaatorliik põlismetsades (Niemelä 2008).

3. MATERJAL JA METOODIKA

Magistritöö andmed on kogutud 63-lt alalt (Lisa 1), kus peapuuliigiks oli harilik kuusk. Valiti puistud vanusevahemikust 41-80 aastat ning viljakatest kasvukohatüüpidest (sinilille (SL), jänesekapsa (JK) ja naadi (ND)). Puidu juurdekasvuproove koguti kokku 756, eelnevalt harvendatud oli nendest 33 ala (396 juurdekasvu proovi) ning harvendamata 30 ala (360 juurdekasvu proovi). Alad pärinevad viiest Eesti maakonnast (Jõgeva-, Tartu-, Põlva-, Võru- ja Valgamaa) (Joonis 2).



Joonis 2. Proovialade paiknemine.

3.1. Välitööd

3.1.1. Juurdekasvuproovide kogumine

Puiduproove koguti 2016. ja 2017. aastal. Töö autor välitöödel ei osalenud aga teab proovide kogumise metoodikast. Igal proovialal mõõdeti 0,25 ha suurune proovitükk ning koguti juhuslikult 12 elusalt harilikult kuuselt juurdekasvuproovid ning hinnati visuaalse mädaniku (perifeerne, tsentraalne) olemasolu juurdekasvuproovidelt ning märgiti üles ka tumenemine (viitab algusjärgus mädaniku olemasolule puidus). Juurdekasvuproovid võeti igalt puult ca 20-30 cm kõrguselt juurekaelalt. Iga puu kohta koguti üks proov, s.o 12 juurdekasvuproovi iga uuritava ala kohta. Võetud juurdekasvuproovid pandi joogikõrtesse ning märgistati ala numbriga ning puu diameetriga. Saaste vältimiseks steriliseeriti juurdekasvupuur peale iga proovi kogumist 96%-lise piiritusega ja gaasipõleti leegis, et vältida ristsaastet puude vahel. Peale välitöid säilitati proove sügavkülmas -20°C juures kuni edasiste laboritööde teostamiseni. 63 alalt koguti kokku 756 juurdekasvuproovi.

3.1.2. Mullaproovide kogumine

Mullaproovid koguti mullaelustiku määramiseks, mis on käesoleva projekti teine osa ning mille tulemusi käesolevas magistritöös ei kajastata. Samadest mullaproovidest eraldati osa mullakeemia määramiseks, mida kasutati käesoleva töö statistilistes analüüsides ning seetõttu ka tuuakse vastav metoodika töösse.

Mullaproovide kogumine teostati vastavalt protokollile (Tedersoo *et al.* 2014). Igalt 0,25 ha suuruselt proovialalt võeti üks mullaproovi, mis koosnes 40-st osaproovist. Proovide kogumiseks valiti 20 juhuslikku puud või kändu selliselt, et vahemaa puude või kändude vahel oleks vähemalt 8 meetrit. Proovide kogumiseks kasutati mullapuuri. Mullaproove koguti iga proovipuu või- kännu kahelt poolt 1-1,5 m kauguselt puust või kännust. Proov koguti ca 5 cm sügavuselt maapinnast. Kogutud proov puhastati vajadusel jämedamatest juurtest ja kividest ning seejärel võeti proovi mõlemast otsast $\frac{1}{4}$ mulda steriilsesse plastikkotti. Ühe ala kohta kogutud mullaproovid segati kotis omavahel kokku. Peale proovide kogumist kuivatati mullaproove toatemperatuuril kuni täieliku kuivamiseni ning pandi uude plastikribaga suletavasse steriilsesse ja markeeritud grip-kotti.

3.2. Laboritööd

Tehtud laboritööd on teostatud töö autori poolt, mille käigus hinnati juurdekasvuproovidelt visuaalset mädaniku (perifeerne, tsentraalne, tumenemine) esinemist ning teostati juurepessu (*Heterobasidion* spp.), külmaseene (*Armillaria* spp.) ja verev nahkise (*Stereum sanguinolentum*) tuvastamiseks liigispetsiifilised molekulaaranalüüsid. Laboritöödeks kuluv aeg oli 440 tundi, mis viidi läbi 11 kuu vältel.

3.2.1. Puiduproovide analüüs

Laboratoorsed tööd teostati Eesti Maaülikooli Metsandus- ja maaehitusinstituudi metsapatoloogia- ja geneetika laboris. Juurdekasvuproovidelt kraabiti skalpelliga õhukesi puidu laaste terve ja mädanikuga puidu piirilt ning pandi kahes korduses (2x0,05g) 2,0 mL microcentrifuge tuubidesse. Puiduproov võtmiseks eemaldati skalpelliga pealmine puidukiht ning tükeldati tuubi 0,05 g puitu alumisest kihist. Pealmise puidukihi eemaldamine on vajalik proovide ristsaaste või juhusliku saaste vältimiseks. Peale igat uuritavat proovi steriliseeriti töövahendid (skalpell, pintsetid) piirituses ja gaasilambi leegis ning puhastati tööpinnad vältimaks saaste teket ja sellest tingitud analüüside ebaõnnestumist.

504 puiduproovi uue põlvkonna sekveneerimine (NGS) teostati Tartu Ülikooli tuumiklaboris Illumina MiSeq (2x300 bp) platvormil. 504 proovi vastavate PCR analüüside teostamisel antud töö autor ei osalenud. Uue põlvkonna sekveneerimise eesmärgiks oli analüüsida lisaks tuntud juure- ja tüvemädanike (juurepess, külmaseen, verev nahkis) tekitajatele ka kõiki teisi võimalikke mädanikutekitajaid hariliku kuuse puistutes. 252 proovile tehti töö autori poolt DNA-põhise meetodika alusel molekulaaranalüüs olulisemate juure- ja tüvemädanike (juurepessu, külmaseene ja verev nahkise) tuvastamiseks EMÜ metsapatoloogia- ja geneetika laboris.

3.2.2. Mullaproovide keemiline analüüs

Proovialadelt kogutud mullaproovidest määrati Eesti Maaülikooli Taimebiokeemia laboris lämmastik (N), kaltsium (Ca), kaalium (K), fosfor (P), magneesium (Mg) ja mulla pH. Süsiniku ja lämmastiku isotoopide suhteline mass (^{13}C , ^{15}N) määrati Münchenis Saksamaal (*Helmholtz Zentrum München*) isotoobi mass-spektromeetriga (*MAT 253; Thermo Electron, Bremen, Germany*), et analüüsida mullas esinevate toitainete mõju juuremädanike levikule ning teiste seente esinemisele.

3.3. Molekulaaranalüüs

Magistritöö autor teostas 252 puiduproovile liigispetsiifilised DNA analüüsid. Molekulaaranalüüsid tehti juurepessu (*Heterobasidion* sp.) perekonna praimeritega (vt. ptk. 3.3.3.), et kindlaks teha proovides juurepessu esinemine perekonna tasemel ning seejärel analüüsiti positiivseid proove (78 proovi) liigispetsiifiliste DNA praimeritega (vt. ptk. 3.3.3.) kahes korduses, et määrata kuuse (*H. parviporum*)- või männi-juurepessu (*H. annosum*) olemasolu. Külmasene (*Armillaria* spp.) perekonna ja verev nahkise (*S. sanguinolentum*) esinemist analüüsiti liigispetsiifiliste DNA praimeritega (vt. ptk. 3.3.3.) kahes korduses nendest proovidest, kus visuaalselt oli mädaniku olemasolu eelnevalt hinnatud (48 proovi 252-st).

3.3.1. DNA eraldamine

Puidu juurdekasvuproovide purustamiseks lisati microcentrifuge tuubi ca viis steriilset metallkuuli ning seejärel purustati puiduproovid homogenisaatoriga (Retsch GmbH, Haan, Germany). Edasiseks DNA eraldamiseks kasutati DNA Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification kit-i, järgides tootja poolset protokollit. Eraldatud DNA-d säilitati edasisteks analüüsideks sügavkülmas - 20°C juures.

3.3.2. Uue põlvkonna sekveneerimine (NGS) ja bioinformaatiline analüüs

Käesoleva magistritöö molekulaarne ja bioinformaatika analüüs on tehtud vastavalt Tedersoo *et al.* (2014) tööle. Sekveneerimisandmete bioinformatiivne analüüs viidi läbi programmis Pipecraft (Anslan *et al.* 2017).

Bioinformaatika tulemusel saadi seenetaksonite andmebaas, millest käesoleva magistritöö autori poolt teostati oluliste patogeensete seente (levinumad mädanike tekitajad ning teised võimalikud mädanikutekitjad) tuvastamine.

3.3.3. Liigispetsiifiline PCR (polümeraasahelreaktsioon) analüüs

Juuremädanike tuvastamiseks kasutati liigispetsiifilist PCR meetodit, mis võimaldab tuvastada patogeeni olemasolu ka väga väikese DNA koguse korral. Töö autori poolt analüüsiti juurepessu, külmaseene ja verev nahkise olemasolu puiduproovidest.

Juurepessu perekonna analüüs

Juurepessu olemasolu kindlaks tegemiseks perekonna tasemel teostati algselt perekonnapõhine molekulaaranalüüs.

Üks PCR segu sisaldas ühe proovi kohta: 4 µl 5x HOTPol Blend Master Mix'i RTL (OÜ Solis Biodyne, Tartu), millele lisati 2x0,5 µl (2x20 µM) vastava patogeeni tuvastamiseks praimereid Het-ITS-F (5'-AGAATGGTATCAATGCTATAAAACG-3') ja Het-ITS-R (5'-ÁGGGTCTCGCTAATGCAT-3') (Aosaar *et al.*, avaldamisel), et kindlaks teha juurepessu olemasolu uuritavates puiduproovides ning lisati veel 1 µl analüüsitavat DNA-d ning 14 µl destilleeritud vett. Analüüside kontrollimiseks lisati negatiivne kontroll, mis proovide õnnestumisel kajastus geelpildis tühja proovina.

DNA amplifitseerimine teostati termotsükleriga Tprofessional Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Saksamaa). Proovide eelkuumutamine toimus +95°C juures 15 minutit, millele järgnes 35 tsükliline DNA denaturatsioon kestvusega 30 sekundit +95°C juures, praimerite seondumine toimus +62°C juures 30 sekundit ning DNA ahela süntees +72°C juures 1 minut. Lõppekstentsioon toimus +72°C juures 10 minutit, millele järgnes masina

seiskumine ning jahtumine +16°C kraadini.

Kuuse- ja männi-juurepess

Kuuse- ja männi-juurepessu analüüsiks kasutati vastavat liigispetsiifilist praimereit KJ-F (5'- CCATTAACGGAACCGACGTG-3') ja KJ-R (5' – GTGCGGCTCATTCTACGCTATC-3') (Hantula, Vaino 2003) või Het.an-ITS-F (5'- GGGTTCTTTTGACCCCTT-3') ja Het.an-ITS-R (5'-CAATCGTGGCGTACCA-3') (Aosaar *et al.* avaldamisel). Kuuse-juurepessu analüüsimiseks kasutati Hantula, Vaino 2003 protokoll. Männi-juurepessu PCR ahelreaktsioon toimus praimeritega (Het.an-ITS-F ja Het.an-ITS-R) järgnevalt: eelkuumutamine kestis 15 minutit +95°C juures, DNA denaturatsioon toimus +95°C juures 30 sekundit, millele järgnes praimerite seondumine +66°C juures 30 sekundit ning sellele järgnes omakorda DNA ahelsüntees +72°C juures kestvusega 1 minut. Lõppekstentsioon toimus +72°C juures 10 minutit, millele järgnes masina jahtumine kuni +16°C –ni.

Külmaseene perekond

Külmaseene olemasolu tuvastamiseks kasutati perekonna põhiseid praimereid Armi-R (5' GCAAGGTGCGTTCAAAGACTCG 3') ja Armi-F (5'GCACGTTTCGACGTGTTGCGTTC 3') ning täpne protokoll on leitav Rosenvald *et al.* (2015).

Verev nahkis

Verev nahkise tuvastamiseks puiduproovidest kasutati käesoleva magistritöö jaoks disainitud liigispetsiifilisi praimereid Ste.san-ITS-F (5'- GGAACCGACGCAAGTCGTAAGT-3') ja Ste.san-ITS-R (5'- CAAGCCCTGGCTTCACCA-3') (Riit *et al.*, avaldamisel). PCR ahelreaktsioon toimus järgnevalt: eelkuumutamine +95°C juures 15 minutit, millele järgnes DNA denaturatsioon

pikkusega 35 tsükli temperatuuril +95°C 30 sekundit, praimerite omavaheline seondumine +68°C juures 30 sekundit ning seejärel DNA ahela sünteesimine ühe minuti jooksul +72°C juures. Lõppekstentsioon toimus +72°C juures 10 minutit, millele järgnes masina seiskumine ja jahtumine +16-ni kraadini.

Igale analüüsile lisati alati positiivne ja negatiivne kontroll. Positiivsele kontrollile lisati vastava patogeeni referentsi (s.o positiivne sama seeneliigi DNA) ning negatiivse kontrollis asendati DNA destilleeritud veega. Proovide õnnestumisel ei tohtinud negatiivne kontroll anda tulemust geleelektroforeesil. Kõik molekulaaranalüüsid DNA amplifitseerimiseks teostati termotsükleriga Tprofessional Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Saksamaa).

3.3.4. Gelelektroforees

PCR produktide kontrollimiseks valmistati esmalt 1%-line agarosgeel. Seejärel laeti geeli vastavalt suurusele ettenähtud kogus DNA Ladder-it ning lisati juurde analüüsitavad PCR produktid. Amplifitseeritud DNA lõigu olemasolu ja pikkus tehti kindlaks UV kiirte abil vastavas transilluminaatoris (21 Quantum ST4-3026/WL/25M) (Vilber Lourmat SAS, Marne-laValée). Geelist saadud pilti töödeldi Quantum ST4 Express v16.04 programmiga (Vilber Lourmat SAS, Prantsusmaa), mille abil tehti kindlaks otsitava patogeeni olemasolu.

3.4. Statistiline analüüs

Harvendusraie ja metsanduslike ning ökoloogiliste parameetrite (puistu keskmine vanus, puistu keskmine diameeter, puistu koosseis, kasvukohatüübid (SL, JK, ND), mulla keemiline koostis ja maakasutuse ajalugu) mõju hindamiseks juuremädanike esinemisele kasutati programme MS Excel ja STATISTICA.

Juurepessu leviku hindamiseks analüüsiti mädanike esinemist juurdekasvuproovides, selleks arvutati haigestunud puude protsent kogu puistu kohta uuritavate puude hulgast. Juurepessu osakaalu ja visuaalse mädaniku tunnuste (nt perifeerne, tsentraalne ja tumenemine) seoste hindamiseks kuuse enamusega puistutes kasutati üldiseid lineaarseid mudeleid (*general linear model*) ja ühesuunalist variatsioonanalüüsi ANOVA (*One-way analysis of variance*) ja 3D jooniseid, et visualiseerida tunnuste vahelisi seoseid. ANOVA on üks lihtsamaid viise võrrelda kahte tunnust, ühte kategoorilist tunnust, mis kirjeldab omavahel võrreldavaid grupe ning ühte arvtunnust, mille osas tahetakse analüüsitavaid grupe omavahel võrrelda. Parima mudeli leidmiseks eemaldati esialgsest mudelist statistiliselt ebaolulised faktorid (*backward elimination method*), kuni alles jäid vaid statistiliselt usaldusväärsed (95% tõenäosus) tunnused. Mudelite loomiseks kasutatud tunnused on kantud tabelisse (Tabel 1).

Tabel 1. Mudelite loomisel kasutatud tunnused koos selgitustega

Tunnused	Selgitus
vanus	puistu keskmine vanus
vanuserühm 20	20 aastase intervelliga vanuserühmad
harvendus	harvendamata (0) ja harvendatud (1)
D	kuuse diameeter 0,2m kõrguselt ehk kännu kõrguselt
D keskmine	kuuse enamusega puistu keskmine diameeter 0,2m kõrguselt
mädaniku hinnang	mädaniku esinemine (0-EI; 1-JAH) (tsentraalne, perifeerne, tumenemine)
KKT	kasvukohatüüp (SL, JK ja ND)
G ku	kuuse rinnaspindala
G	puistu rinnaspindala
raiate arv	see tähendab, kas puistu oli üks kord või kaks korda harvendatud või oli harvendamata
aeg esimesest raiest	kui mitu aastat on möödas esimesest raiest
okaspuu koosseis	kuuse ja männi protsentuaalne esinemine puistus
lehtpuu koosseis	haava ja kase protsentuaalne esinemine puistus
KU koosseis	kuuse protsentuaalne osa puistu koosseisust
MA koosseis	männi protsentuaalne osa puistu koosseisust
HB koosseis	haava protsentuaalne osa puistu koosseisust
KS koosseis	kase protsentuaalne osa puistu koosseisust
pH	mulla pH
P	mulla fosfori sisaldus
K	mulla kaaliumi sisaldus
Mg	mulla magneesiumi sisaldus
Ca	mulla kaltsiumi sisaldus
ajalooline maakasutus	endine põllumaa (0) ja põline metsamaa (1)
juurepessu olemasolu	juurepessu esinemine (0-EI; 1-JAH) molekulaaranalüüsi tulemusel
juurepessu osakaal	juurepessu protsentuaalne esinemine puistus

Märkus. Antud tabel selgitab mudelite loomiseks kasutatud tunnuseid ja nende sisulist tähendust.

Statistilisest andmeanalüüsist jäeti välja külmaseene (*Armillaria* spp.) ja verev nahkise (*Stereum sanguinolentum*) molekulaarsete andmete tulemused nende vähese esinemise tõttu analüüsitud proovides. Külmaseent esines analüüsitud proovides (N=756 proovi) 1,6% ning verev nahkist 4,5 %.

4. TULEMUSED

4.1. Visuaalne mädaniku esinemise hinnang kuusikutes

Juurdekasvuproovidel hinnati visuaalselt perifeerse- ja tsentraalse mädaniku olemasolu ning tumenemist (s.o. algstaadiumis mädanik). Mädaniku olemasolu (perifeerne, tsentraalne ja tumenemine) tuvastati 245 puult vanusevahemikus 41-80 aastat, ehk mädanik tuvastati 32,4% puudest. Erinevate faktorite mõju juuremädanikele hindamiseks kasutati üldist lineaarset mudelit (GLM). Saadud mudeli seos oli nõrk, kuid statistiliselt usaldusväärne ($r^2=0,043$; $p<0,001$).

$$\text{Mädaniku hinnang} = a_0 + a_1 \cdot HB + a_2 \cdot HR + a_3 \cdot JK + a_4 \cdot AM \quad (4.1.)$$

kus HB on haava koosseis;

HR – kui harvendusraiet ei ole tehtud, siis 1, harvendatud juhul 0;

JK – kui on jänesekapsa kasvukohatüüp, siis on 1, teiste kkt puhul 0;

AM – kui ajaloolise maakasutuse puhul on tegemist põlise metsamaaga, siis on 0, endine põllumaa on 1;

a_1, \dots, a_4 – valemi konstandid (Tabel 2)

Tabel 2. Visuaalse mädaniku hinnangu valemi konstandid

Valemi konstant	Konstandi hinnang	<i>P-value</i>
a_0	0,326340	<0,001
a_1	0,035268	<0,05
a_2	0,065297	<0,05
a_3	0,137218	<0,001
a_4	0,065225	<0,05
Kogu mudeli r^2	0,043264	
Kogu mudeli p-value	<0,001	

Statistiliselt olulist mõju mädanike levikule puistus avaldas haava koosseis ($p<0,05$), mille osakaalu suurenemisel puistus suureneb ka mädanike esinemise rohkus. Harvendusraie mõju oli statistiliselt oluline ($p<0,05$), kirjeldades positiivsest seosest harvendamata alade

ja mädanike vahel. Kasvukohatüüpidest oli statistiliselt oluline seos ($p < 0,001$) jänsekapsa kasvukohatüübil juuremädanike olemasoluga puitus, teistel kasvukohatüüpide mõju mädanike esinemisele polnud oluline. Maakasutusajaloost avaldas mõju mädanike levikule endine põllumaa ($p < 0,05$), suurendades mädanike esinemise riski. Loodud mudeli tunnuste vahel on nõrk seos ($r^2 = 0,043$), kuid analüüsitud faktorite kirjeldatud koosmõju mudelis on oluline ($p < 0,001$). Antud mudelis esinevad faktorid kirjeldavad 4,3% mädanike olemasolust, ülejäänud 96% sõltub teistest mõjutavatest teguritest, mida antud mudelis ei esine.

4.2. Juurepessu esinemise osakaal

Juurepessu esinemise hindamiseks molekulaarsel meetodil ehk DNA põhiselt koostati üldine lineaarne mudel, mis kirjeldab, millised faktorid mõjutavad juurepessu esinemise osakaalu. Juurepessu osakaalu puhul arvutati juurepessu esinemise protsent puistus. Juurepessu esinemist tuvastati 241-st puiduproovist (31,9%) 41-80 a. kuuse enamusega puistutes, mille tulemusel on analüüsitud puudest juurepessu nakkusega enam kui 1/3. Juurepessu osakaalu (%) hindamisel tõestas tehtud mudel, et analüüsitud faktoritest (Tabel 1) mõjutavad juurepessu osakaalu kuuse enamusega puistus oluliselt okaspuu- ja lehtpuu koosseis, mulla pH ja mullas esinevate elementide P, K ja Mg sisaldus ning seegi, kas tegemist oli põlise metsamaaga või endise põllumaaga. Ülejäänud uuritavad muutujad jäid mudelist välja, kuna ei avaldanud olulist mõju juurepessu osakaalule puistus.

$$\text{Juurepessu osakaal} = a_0 + a_1 \cdot OP + a_2 \cdot LP + a_3 \cdot pH + a_4 \cdot P + a_5 \cdot K + a_6 \cdot Mg + a_7 \cdot AM, \quad (4.2.)$$

kus OP on okaspuu koosseis;

LP – lehtpuu koosseis;

pH – mulla pH;

P – mulla fosfori sisaldus;

K – mulla kaaliumi sisaldus;

Mg – mulla magneesiumi sisaldus;

AM – põline metsamaa on 0, endine põllumaa on 1;

$a_1 \dots a_7$ on valemi konstandid (Tabel 3).

Tabel 3. Juurepessu osakaalu valemi konstandid

Valemi konstant	Konstandi hinnang	<i>P-value</i>
a ₀	-208,748	<0,001
a ₁	2,302	<0,001
a ₂	2,489	<0,001
a ₃	4,297	<0,001
a ₄	-0,036	<0,001
a ₅	-0,151	<0,001
a ₆	0,042	<0,001
a ₇	-3,335	<0,001
Kogu mudeli r²	0,154834	
Kogu mudeli <i>p-value</i>	<0,001	

Loodud mudeli parameetrite hinnangust selgub, et okaspuu- ja lehtpuu koosseisu suurenemisel suureneb ka juurepessu esinemise tõenäosus puistus. Kui mulla pH muutub aluselisemaks, suureneb juurepessu kahjustus puistus ($p < 0,001$). Magneesiumi suurenemisel ($p < 0,001$) mullas kasvab juurepessu esinemise tõenäosus puistus, kuid kaaliumi ja fosfori osakaalu kasvamisest ($p < 0,001$) mullas vastupidiselt juurepessu osakaal väheneb. Juurepessu esinemise tõenäosust mõjutab ka see, et kui on tegemist endise põllumaaga ($p < 0,001$) on juurepessu esinemise risk väiksem, mis on vastupidine tulemus varasemale teadmisele. Analüüsitavaatel faktorite koosmõjul mudelis on keskmine seos ($r^2 = 0,155$; $p < 0,001$), kirjeldades 15,5% juurepessu osakaalu esinemise tõenäosusest. Põlise metsamaa olulist mõju juurepessu esinemisele ei tuvastatud.

4.3. Puistu vanuse, harvendusraie ja maakasutuse mõju juurepessu osakaalule

Erinevate faktorite koosmõju olulisuse hindamisel juurepessu esinemise osakaalule analüüsiti kahe tunnusevahelist seost, visualiseerides antud tulemusi joonistel 3 ja 4.

Kuuse enamusega puistute vanuse, harvendusraiete ja maakasutuse (endine põllumaa ja põline metsamaa) seoste hindamiseks juurepessu osakaalule kasutati ühesuunalist variatsioonanalüüsi ANOVA.

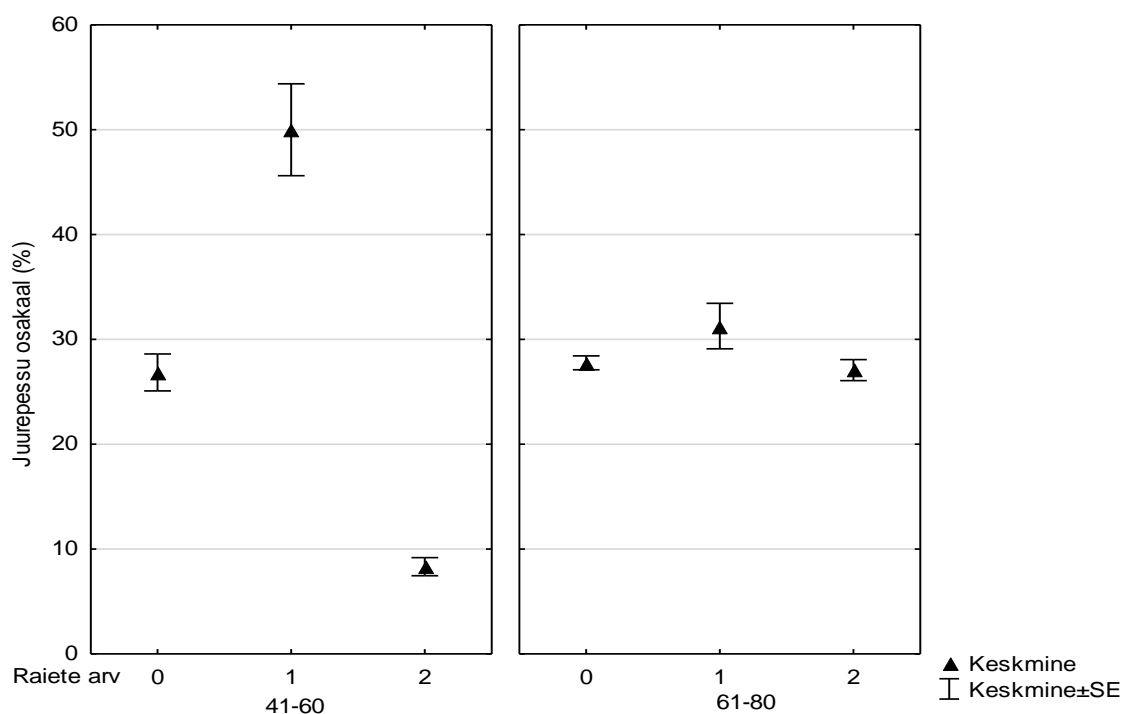
Juurepessu osakaalu esinemist hinnati kahes vanusevahemikus (41-60 a. ja 61-80 a.), kus analüüsiti kogu uuritavat valimit ($N = 756$ puiduproovi 63 alalt). Tulemused näitasid, et

juurepessu kahjustuse osakaal (32,5%) oli suurem nooremas vanusevahemikus (41-60 a.) võrrelduna vanema (61-80 a.) vanusevahemikuga (31,5 %). Kuid siiki vanusevahemike vahel ei ole statistiliselt olulist erinevust ($p=0,44$) juurepessu esinemisele puistutes.

4.3.1. Harvendusraie mõju juurepessu osakaalule

Analüüsi raie toimumise (harvendatud või harvendamata) ja kordade (s.o. kas oli teostatud üks või kaks harvendusraiet või polnud eelnevalt harvendusraied tehtud) mõju juurepessu levikule. Raie toimumise (harvendatud või harvendamata) hindamisel analüüsi kogu uuritavat valimit ($N=756$ proovi 63- alalt) mõlema vanusevahemiku (41-60 a. ja 61-80 a.) kohta kokku (41-80 a.). Harvendatud ja harvendamata alade vahel ei esinenud statistiliselt olulist erinevust ($p>0,16$) juurepessu levikule, kuid harvendamata aladel oli juurepessu osakaal suurem (33%) võrreldes harvendatud alade osakaaluga (31%).

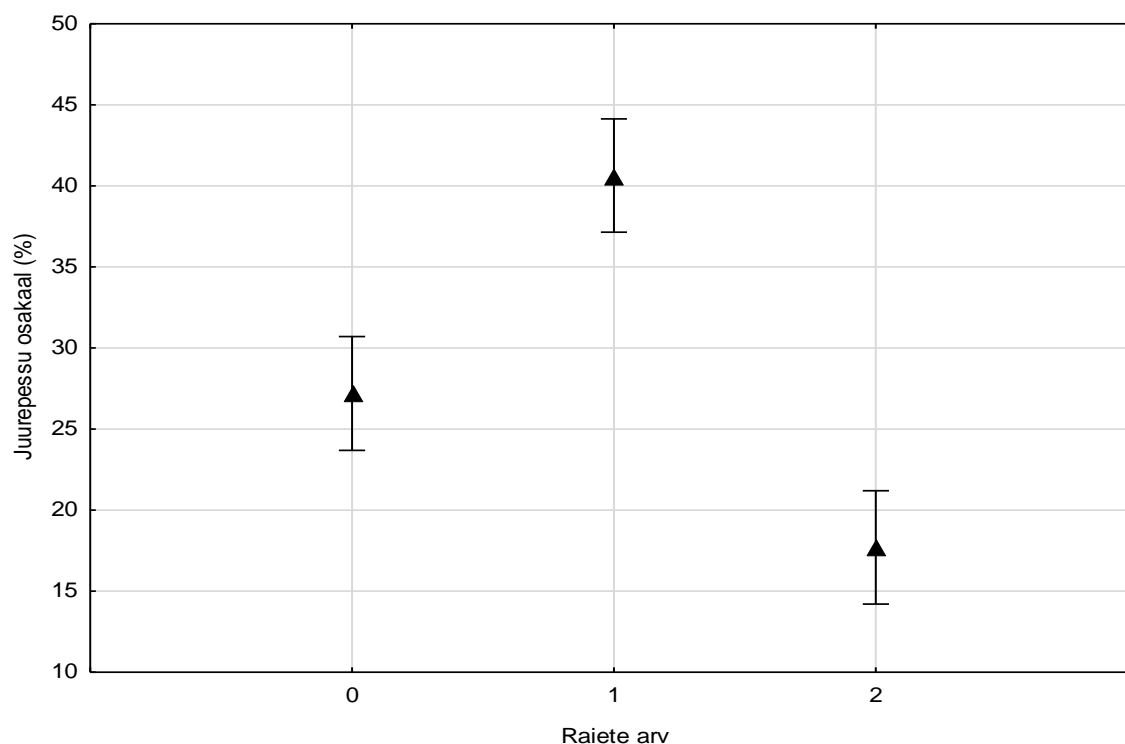
Harvendusraiate kordade mõju juurepessu levikule analüüsi kogu uuritavat valimit ($N=756$ proovi 63 alalt) vanusevahemike (41-60 a. ja 61-80 a.) kaupa (Joonis 3).



Joonis 3. Vanusevahemike (41-60 a. ja 61-80 a.) ja raie kordade arvu mõju juurepessu osakaalule harvendamata (0), üks kord harvendatud (1) ja kaks korda harvendatud (2) kuuse enamusega puistutes.

Analüüsi tulemustest selgus, et oluline erinevus harvendusraie kordade arvu vahel esines ($p < 0,001$) vaid nooremas (41-60 a.) vanusevahemikus, kus kõigi kolme (harvendamata, üks kord ja kaks korda harvendatud) grupi vahel esines oluline erinevus ($p < 0,001$). Madalam juurepessu osakaal oli kaks korda harvendatud puistutes (8%) võrreldes üks kord harvendatud (50%) ja harvendamata (27%) puistutega. Vanemas (61-80 a.) vanusevahemikus statistiliselt olulist erinevust raie kordade vahel ei esinenud ($p > 0,05$). Tulemused (Joonis 3) näitavad ka seda, et hilisemas vanuses ei mõjuta teostatud harvendusraie arv juurepessu osakaalu oluliselt, kuna olenemata teostatud/teostamata harvendusraietest ei erine juurepessu osakaal harvendamata (28%), ühe korra harvendatud (31%) ja kaks korda harvendatud (27%) alade vahel ($p > 0,05$) oluliselt.

Mõlemate vanusevahemike kohta kokku (41-80 a.) analüüsiti võrdluseks võrdne arv alasid ($N=8$) (olenemata vanuselisest jaotusest), millel oli teostatud, kas kaks harvendusraiet või üks harvendusraie või puistu oli harvendamata (iga raieviisi kohta kokku 96 proovi) (Joonis 4).

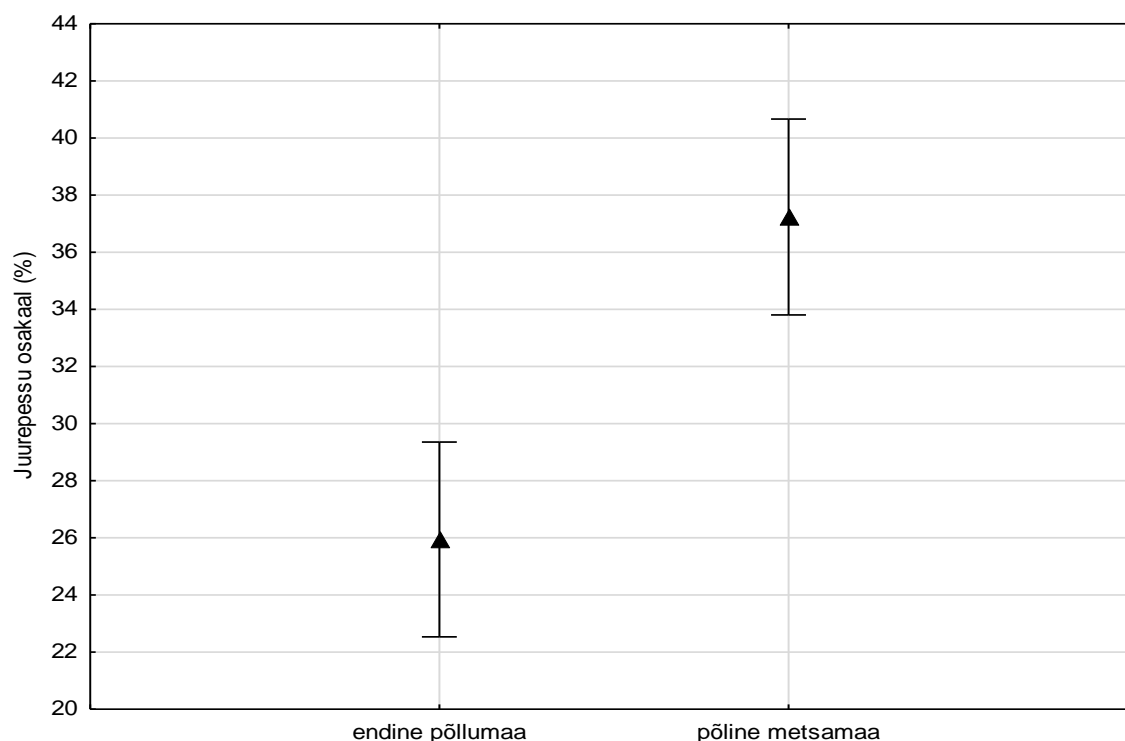


Joonis 4. Harvendusraiete mõju juurepessu leviku osakaalule harvendamata (0), 1x harvendatud (1) ja 2x harvendatud (2) kuuse enamusega puistutes.

Juurepessu esinemise osakaal erines oluliselt ($p < 0,001$) harvendamata, üks kord harvendatud ja kaks korda harvendatud puistute vahel. Kaks korda harvendatud puistutes oli juurepessu osakaal madalam (17%) võrreldes üks kord harvendatud (41%) ja harvendamata (27%) puistutega (Joonis 4).

4.3.2. Eelneva maakasutuse mõju juurepessu osakaalule

Lisaks hinnati ka eelneva maakasutuse (endine põllumaa ja põline metsamaa) mõju juurepessu levikule (Joonis 5). Andmeanalüüsiks valiti välja kõik alad, mis asusid endisel põllumaal ($N=9$), millest neljal alal oli teostatud harvendusraie ning viis ala olid harvendamata. Juhuslikult valitud harvendatud aladest esines ühel alal ka kaks korda teostatud harvendusraie. Võrdluseks valiti juhuslikult üheksa põlise metsamaa ala, millest viis ala olid eelnevalt ühe korra harvendatud ja neli harvendamata.

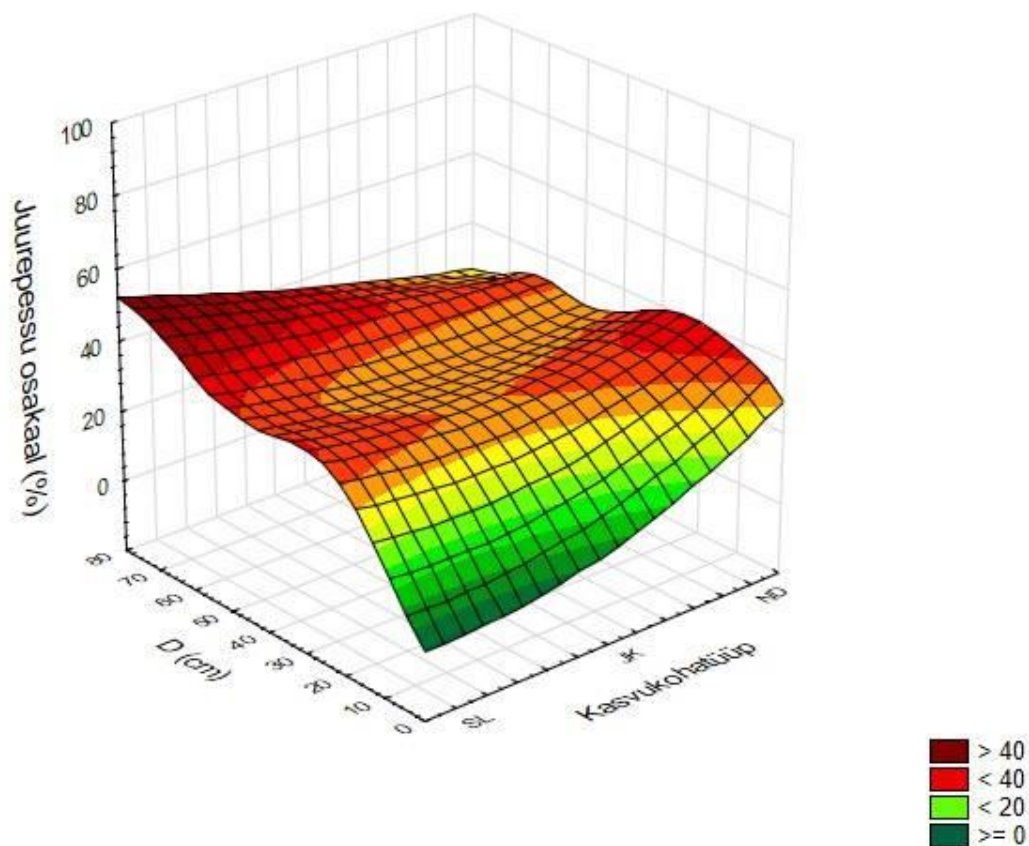


Joonis 5. Maakasutuse erinev (endine põllumaa ja põline metsamaa) mõju juurepessu levikule ja esinemisele.

Analüüsi tulemustest selgus, et kahe erineva maakasutusega puistutes esines oluline erinevus ($p < 0,001$) juurepessu esinemisele. Endisele põllumaale (s.h niit või heinamaa) rajatud puistutes oli juurepessu osakaal 26%, mis on 11% võrra madalam põlisele metsamaale rajatud kuuse enamusega puistutes esinevast juurepessu esinemisest (37%). Maakasutust iseloomustavatel faktoritel on nõrk ($r^2 = 0,091$) kuid oluline seos juurepessu esinemisega, mis kinnitab juurepessu osakaalu mõju sõltuvust endisest maakasutusest.

4.4. Kuuse enamusega puistute diameetri ja kasvukohatüüpide mõju juurepessu levikule

Diameetri ja kasvukohatüüpide (JK, SL, ND) mõju juurepessu levikule visualiseeriti 3D joonisel, et analüüsida, kas puude keskmine diameetri suurenemisel muutub analüüsitud kasvukohatüüpides juurepessu esinemise osakaal (Joonis 6).



Joonis 6. Juurepessu osakaalu sõltuvus diameetri ja kasvukohatüüpide koosmõjust.

Antud analüüs näitab, et peenemas diameetriklassis (10-20 cm) esineb juurepessu kõige enam naadi kasvukohatüübi kuuskutes (30%), kuid jämedamas diameetriklassis (70-80 cm) on kõrgem juurepessu osakaal (50%) sinilille kasvukohatüübis. Jämedamas diameetriklassis (70-80 cm) toimub juurepessu osakaalu vähenemine naadi kasvukohatüübis (vastavalt 30%), mis on 20% väiksem, kui sama diameetriklassi sinilille kasvukohatüübi puistutes. Diameetriklassis 40-60 cm toimub juurepessu osakaalu vähenemine kõigis kolmes (JK, SL, ND) analüüsitavas kasvukohatüübis, mis viitab ilmselt nakkusega puude väljaraiele ning harvendamata alade puhul puude suremusele teiste patogeenide kaasabil.

4.5. Teised võimalikud mädaniku tekitajad

Teiste võimalike mädanikutekitajate teadasaamiseks analüüsi proove uue põlvkonna sekveneerimise abil ehk analüüsi saadud andmeid OTU (taksonoomiline üksus) tabelis (N=504). Tabeli põhjal hinnati teiste võimalike mädanikutekitajate esinemist puiduproovides perekonna tasemel ning nende esinemise hulk koos protsendiga (üks rida OTU tabelis loeti ühe liigi esinemiseks perekonna tasemel) on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Teiste võimalike mädaniku tekitajate esinemine elusate kuuskede puiduproovides vanusevahemike (41-60 a. ja 61-80 a.) kaupa vastavalt harvendatud (H) ja harvendamata (MH) aladel

Takson	41-60 a.		61-80 a.		Seente esinemise osakaal (%) puiduproovides	
	H	MH	H	MH	H	MH
<i>Phellinus</i> sp.	8	1	5	2	2,6	0,6
<i>Antrodia</i> sp.	5	5	2	6	1,4	2,2
<i>Bjerkandera</i> sp.	6	2	3	0	1,8	0,4
<i>Fomitopsis</i> sp.	21	2	26	14	9,3	3,2
<i>Gloeophyllum</i> sp.	11	1	6	5	3,4	1,2
<i>Hyphodontia</i> sp.	14	1	15	5	5,8	1,2
<i>Ganoderma</i> sp.	10	2	6	6	3,2	1,6
<i>Onnia</i> sp.	16	1	5	0	4,2	0,2
<i>Climacocystis borealis</i>	5	0	5	3	2	0,6

Tabelis 4 on esitatud üheksa võimalikku mädanikutekitajat, mis lisaks juurepessule, külmaseenele ja verev nahkisele võivad olla mädaniku tekitajaks kasvavatel hariliku kuuse puudel. Antud tulemused annavad ülevaate, mitmes proovis uuritavaid seeni esines ning kui suur on nende mädanikutekitajate osakaal analüüsitud puiduproovidest.

Tabel 4 andmed näitavad, et nii harvendatud kui ka harvendamata aladelt kogutud juurdekasvuproovides korduvad samad liigid, kuid harvendatud aladel on lisaks teadaolevatele ka teiste võimalike mädanikutekitajate esinemise tõenäosus suurem. Enam levinud seene perekonnad harvendatud aladel mõlemas vanusevahemikus on *Fomitopsis* sp. (9,3%), *Hyphodontia* sp. (5,8%) ja *Onnia* sp. (4,2%) ning harvendamata puistutes mõlemas vanusevahemikus *Fomitopsis* sp. (3,2%), *Antrodia* sp. (2,2%) ja *Ganoderma* sp. (1,6%).

Nimetatud mädanikutekitajaid esinesid koos juurepessu, külmaseene ja verev nahkisega kokku 225 puiduproovis, moodustades 44,9% OTU tabeli andmestikust (N=504) analüüsitud proovide hulgast. Antud 44,9% -st esines juurepessu, külmaseent ja verev nahkist 38% ulatuses, mistõttu saame öelda, et teised mädanikutekitajaid tekitasid mädanikku 6,9 % proovidest.

Haruldastest kaitsealustest seentest tuvastati sekveneerimise tulemusel elusaltelt mädaniku tunnustega hariliku kuuse puudelt roosa pessu (*Fomitopsis rosea*) esinemist kolmest puiduproovist.

5. ARUTELU

Käesolevas magistritöös analüüsiti metsanduslike ning ökoloogiliste parameetrite mõju juure- ja tüvemädanike levikule 41-80 aastastes hariliku kuuse enamusega puistutes. Harvendusraiate mõju hindamisel juurepessu osakaalule selgus, et harvendamata ja harvendatud puistute vahel ei ole statistiliselt olulist erinevust ($p>0,16$). Puistute keskmine juurepessu nakkuse osakaal harvendamata ja harvendatud puistutes erines marginaalselt, vastavalt 33% ja 31%. Veidi kõrgem juurepessu nakkuse osakaal harvendamata aladel võib olla tingitud sellest, et harvendamata aladel on siiski teostatud dokumenteerimata harvendusraieid või pärineb juurepessu nakkus eelmisest metsapõlvest, kuna raiete käigus tekkinud kändud loovad ideaalsed tingimused seennakkuste levikuks (Stenlid 1987; Piri 1996). Korhonen *et. al* (1998) andmetel aga suureneb juuremädanike osakaal teostatud harvendusraiate tulemusel, mida näitasid ka käesoleva töö tulemused peale esimest harvendusraiet (vt. Joonis 3), kuid kogu andmestikku arvesse võttes ei ole raied üksi juurepessu leviku mõjutajad. Käesolevas töös analüüsitud vanusevahemikus (41-80.a.) raiutakse nakkusega puud välja ja seetõttu on haigestunud puid valimis vähem.

Analüüsides raiete kordade (s.o. kas puistus oli tehtud eelnevalt üks või kaks harvendusraiet või polnud eelnevalt üldse raieid teostatud) mõju juurepessu levikule vanusevahemike (41-60 a. ja 61-80 a.) kaupa kogu analüüsitavast valimist (756 puiduproovi 63 alalt) selgus, et harvendusraiate kordustel on mõju juurepessu levikule vaid nooremas (41-60 a.) vanusevahemikus, kus harvendamata (27%), üks kord harvendatud (50%) ja kaks korda harvendatud (8%) puistutes esines statistiliselt oluline erinevus ($p<0,001$). Seevastu aga vanemas vanusevahemikus (61-80 a.) harvendamata (28%), üks kord harvendatud (31%) ja kaks korda harvendatud (26%) aladel statistiliselt oluline erinevus ($p>0,05$) raiete kordade vahel puudub. Kui analüüsiti igast rühmast (harvendamata, 1x harvendatud ja 2x harvendatud) võrdne arv alasid ($N=8$) kogu analüüsitava vanusevahemiku (41-80 a.) kohta, siis saadud tulemused näitasid, et harvendusraiate kordade arvu vahel esineb statistiline oluline erinevus ($p<0,001$). Kaks korda harvendatud puistutes oli juurepessu osakaal madalam (17%) võrreldes üks kord harvendatud (41%) ja harvendamata (27%) puistutega. Madalam juurepessu nakkus kaks korda harvendatud aladel võib olla põhjendatav sellega, et antud puistutes on raiete käigus eemaldatud juba eelnevalt surnud või haigestunud puud. Samas kõrgem juurepessu osakaal

üks kord harvendatud aladel võib tuleneda sellest, et peale esimest harvendusraiet toimub patogeeni intensiivne levik (Rönnberg *et al.* 2007), sest esimene harvendusraie teostatakse tavaliselt noores eas, mistõttu luuakse tingimused patogeeni pikaajaliseks arenguks puistus. Hilisemas vanuses teostatud raie tõttu ühtlustub juurepessu leviku ulatus raie kordade vahel, kuna patogeenil on vähem aega areneda kuni puistu lõppraiesse jõudmiseni, mida on näha vanemas vanusevahemikus (61-80 a.), kus statistiliselt oluline erinevus ($p>0,05$) harvendusraie kordade vahel puudub. Harvendamata aladel esineva juurepessu nakkuse põhjuseks võib olla eelmise metsapõlvkonna nakatunud kännud, mis mõjutavad uue puistu tervislikku seisundit. Harvendamata aladel on puude tihedus puistus suurem ja seega esineb ka enam juurkontakte. Kuid Norras tehtud uuringust selgus, et väiksem puistu algtihedus pärsib juurepessu levikut, kui puistu eluea jooksul teostatud harvendusraie hulk on minimaalne (Hanso, Hanso 1999b), samuti on siis nakatumine juurekontaktide kaudu madalam.

Raie hulga ja juurepessu osakaalu vahelisele seosele antud töö tulemuste põhjal on keeruline anda lõplikku hinnangut, sest käesoleva töö aluseks oli ebaühtlane alade jaotus: harvendamata 30 ala, 1x harvendatud 25 ala, 2x harvendatud 8 ala. Kui võrdluseks valiti igast gurpist (harvendamata, 1x harvendatud, 2x harvendatud) võrdne arv alasid ($N=8$ ala), siis statistiline analüüs näitab harvendusraie kordade vahel statistilist olulist erinevust ($p<0,001$) ehk kahekordne raie antud vanusevahemikus hoopis vähendas kahjustusega puude osakaalu. Mida see tegelikult tähendab juurepessu levikule kändudes ja juuresüsteemis ei ole selge, sest kände ja juureproove antud katsealadelt ei kogutud.

Analüüsides maakasutusajaloo (endine põllumaa $N=9$ ja põline metsamaa $N=9$) mõju juurepessu levikule selgus, et enam on kahjustatud patogeeni poolt eelkõige põlisel metsamaal kasvavad puistud. Üks põhjustest, miks antud töö käigus analüüsitud endisel põllumaal või niidul kasvavates puistutes on juurepessu osakaal väiksem (26%), kui põlisel metsamaal (37%) võib olla tingitud sellest, et endisel põllumaal puudub eelneva metsapõlvkonna negatiivne mõju ning raie intensiivsus nooremas eas võis olla madalam. Swedjemark ja Stenlid (1993) andmetel on juurepessu osakaal kõrge just endisele põllumaale rajatud okaspuu kultuurides, kuna nendel aladel puuduvad metsamullale iseloomulikud mikroorganismid, mis takistaksid juurepessu levikut. Samas aga sõltub juurepessuga nakatumine lähedal asuvatest puistutest ja nende tervislikust seisundist, ning 41-80 a. puistutes võiks juba esineda metsamullale iseloomulikud mikroorganismid.

Varasemate uurimuste põhjal on teada, et mõnevõrra väiksem on juurepessu kahjustuste osakaal puistutes, kus lisaks harilikule kuusele esineb ka lehtpuid (Hanso, Hanso 1999b).

Käesoleva töö tulemuste põhjal selgus, et kuuse enamusega puistu (s.o. kuuske on 50% ja enam) koosseisust kuni 40% moodustab lehtpuu, siis see ei takista juurepessu levikut. Kuid oluline on ka märkida, et antud töö käigus analüüsitud alade keskmine lehtpuu osakaal oli vaid 9% ning 18 alal 63-st ei esinenud üldse lehtpuid, mistõttu oleks vajalik lehtpuude osakaalu mõju kuuse enamusega viljakates puistutes põhjalikumalt uurida. Samuti avaldas juurepessu levikule positiivset mõju haava koosseis, mis võib tuleneda sellest, et haab on ise ka vastuvõtlik juuremädanikele. Samas aga esines analüüsitud puistutes haaba kuni 10% ulatuses, mistõttu ei pidurda nii väike haava osakaal puistus juuremädanike levikut. Seevastu aga okaspuu osakaalu ($\geq 50\%$ kuuse osaluse puhul) suurenemine puistus suurendab ka juurepessu osakaalu, sest samaliigiliste puude juured on omavahel kokku kasvanud, mis loob tingimused patogeeni kiireks levikuks ühe puu juurtelt naaberpuu juurtesse (Hanso, Öunap 2016).

Hariliku kuuse enamusega puistute nakatumine juurepessu sõltub oluliselt millisesse kasvukohatüüpi on puistu rajatud, kuna viljakad kasvukohatüübid (sinilille, jänesekapsa ja naadi) on juuremädanike poolt enim ohustatud (Drenkhan *et al.* 2014). Juurdekasvuproovide visuaalse mädaniku hinnangu põhjal selgus, et mädaniku levik on intensiivsem jänesekapsa kasvukohatüübi puistutes (N=41). Sinilille (N=14) ja naadi (N=8) kasvukohatüübi alasid oli analüüsis oluliselt vähem, seega antud kasvukohatüüpide võrdlust ei saa võtta lõpliku tõena.

Analüüsides kasvukohatüübi ja diameetri koosmõju juurepessu levikule selgus, et jämedamas diameetriklassis (70-80 cm) on juurepessu poolt enim kahjustatud sinilille kasvukohatüübis (50%) kasvavad kuused, seejärel jänesekapsa (40%) ja naadi (30%) kasvukohatüübi puud. Kõigis kolmes analüüsitavas kasvukohatüübis esines 40-60 cm diameetriklassis juurepessu osakaalu langus $\sim 10\%$, mis võib tuleneda antud vahemikus teostatud raie, mille käigus haiged puud eemaldati. Viljakates kasvukohatüüpides võiks kaaluda teiste puuliikide kultiveerimist või segapuistute kasvatamist, et vähendada antud aladel juurepessu kahjustusi. Samuti on vaja viljakatel kasvukohatüüpidel (eelkõige sinililles ja jänesekapsas) kasutada biopreparaati Rotstop, et vähendada juurepessu levikut. Oluline roll on ka mulla toitainete sisaldusel juurepessu levikule. Juurepessu levik on soodustatud viljakatel muldadel, kus esineb kõrge mulla pH ja kõrge kaltsiumi sisaldus (Korhonen, Stenlid, 1998). Antud töö tulemustest selgus, et juurepessu osakaalule avaldab olulist mõju ($p < 0,001$) mulla pH, magneesiumi-, kaaliumi- ja fosfori sisaldus. Aluseline mulla pH ja magneesiumi sisalduse kasvamine mullas avaldavad positiivset mõju juurepessu levikule, mille tulemusel juurepessu osakaal puistus suureneb. Kuid vastupidine

mõju oli suuremal mulla kaaliumil ja fosfori sisaldusel, mille tõttu juurepessu osakaal väheneb. Eestis (Karu 1953) ja Rootsis (Laine 1979) läbi viidud katsetest on teada, et suur lubjasisaldus ja kõrge pH mullas mõjutavad positiivselt juurepessu levikut. Saadud tulemuste põhjal võib öelda, et mulla omadused mõjutavad samaväärselt või enamgi juuremädanike levikut, kui teised faktorid (nt. harvendusraie).

Antud vanusevahemikus (41-80 a.) on põhiliseks mädaniku tekitajaks juurepess, mida tuvastati 241-st proovist, moodustades 31,9% kogu analüüsitud proovide (N=756) hulgast. Vähesel määral esines ka külmaseent (1,6%) ja verev nahkist (4,5%), kokku on nende kahjude osakaal vaid 6%. Juurepessu ulatusliku leviku põhjus võib olla tingitud sellest, et tegemist on väga agressiivse patogeeni, mis suudab nakatada ka terveid puid (Piri, Korhonen 2008). Kuid külmaseen ja verev nahkis kahjustavad enamasti puid, mis on juba eelnevalt, kas mõne tugevama patogeeni (juurepess) või raiete käigus tekkinud tüvevigastuste tagajärjel nõrgestatud (Hanso, Hanso 1999a; Hanso, Drenkhan 2007).

Visuaalse mädaniku hinnangu (perifeerne, tsentraalne ja tumenemine) põhjal hinnati mädaniku esinemist 245 juurdekasvuproovilt, kuid molekulaarsete andmete tulemusel tuvastati juurepessu (241 proovi), külmaseent (12 proovi) ja verev nahkist (34 proovi) esinemist kokku 287-st puiduproovist. See tähendab, et olulisemate mädaniku tekitajate kahjude osakaal vanuses 41-80 aastat on 38%, millest juurepessu esines 31,9%, külmaseent 1,6% ja verev nahkist 4,5%. Visuaalse ja molekulaarse hindamise erinevus on 6% molekulaarse tuvastamise kasuks ehk see näitab nakkuse osa mädaniku tunnusteta proovides. Antud tulemuse põhjal saab öelda, et mädanikutekitajate liike on keeruline visuaalsel teel hinnata, kuna antud seened esinevad ka nähtavalt tervetes puudes, mistõttu on oluline teostada molekulaarseid analüüse juuremädanike täpseks tuvastamiseks.

Käesoleva töö tulemuste põhjal selgus, et verev nahkise määramiseks ja tuvastamiseks disainitud praimerid Ste.san-ITS-F ja Ste.san-ITS-R (Riit *et al.* avaldamisel) töötavad, kuna liigi määramine õnnestus ka kõikides positiivsetes kontroll proovides.

Teisi mädanikutekitajaid tuvastati 44,9% OTU tabeli andmete põhjal (N=504), millest enamik liike esines koos juurepessu, külmaseene ja verev nahkisega. Kaitsealustest seeneliikidest tuvastati roosa pessu (*Fomitopsis rosea*) esinemist kolmest puiduproovist.

Edasiste uurimuste puhul tuleb hinnata ka sesoonset mõju juuremädanike levikule. Samuti on vaja teada, kuidas õhutemperatuuri muutused (s.o pehmemad talved) mõjutavad juuremädanike levikut, mis annaks võimaluse hinnata seoseid juuremädanike ja temperatuuri vahel. Oluline on teada ka eelmise metsapõlvkonna tervislikku seisundit, et paremini hinnata juuremädanike leviku ulatust uues metsapõlvkonnas.

KOKKUVÕTE

Magistritöö eesmärgiks oli uurida juuremädanike esinemist harvendatud ja harvendamata kuuse enamusega puistutes vanusevahemikus 41-80 aastat ning välja selgitada teiste olulisemate juuremädanike tekitavate seente liigiline koosseis kasutades tuvastamiseks liigispetsiifilisi praimereid ja uue põlvkonna sekveneerimist (NGS). Juuremädanikud on levinud ning põhjustavad olulist kahju hariliku kuuse puistutes viljakates kasvukohatüüpides (eelkõige jänsekapsa, sinilille, aga ka naadi) ning patogeenide esinemine puistus vähendab puude eluiga, juurdekasvu ja puidu kvaliteeti, mistõttu on oluline teada ja hinnata kuuse enamusega puistutes juuremädanike osakaalu.

Käesolevas töös analüüsitud juurdekasvuproovid (N=756) koguti 2016. ja 2017. aastal 63 proovialalt elusalt hariliku kuuse (*P. abies*) puudelt viiest Eesti maakonnast (Jõgeva-, Tartu-, Põlva-, Võru- ja Valgamaa). Kogutud juurdekasvuproovidest (N=756) analüüsiti 252 puiduproovi Eesti Maaülikooli metsapatoloogia ja -geneetika laboris teostades liigispetsiifilisi DNA analüüse juurepessu (*Heterobasidion* spp.), külmaseene (*Armillaria* spp.) ja verev nahkise (*Stereum sanguinolentum*) tuvastamiseks ja määramiseks. 504 juurdekasvuproovile (756 proovist) teostati Tartu Ülikooli tuumiklaboris uue põlvkonna sekveneerimine, et lisaks olulisematele mädaniku tekitajatele tuvastada teiste mädanikku tekitavate seente olemasolu puiduproovidest.

Käesolevas töös analüüsiti 756 hariliku kuuse juurdekasvuproovi vanusevahemikus 41-80 aastat, millest 241 proovis tuvastati juurepessu (*Heterobasidion* spp.) esinemine, mis moodustab 31,9% analüüsitud proovide hulgast. Vähesel määral tuvastati ka külmaseene (1,6%) ja verev nahkise (4,5%) esinemist, kokku oli nende poolt tekitatud kahjude osakaal vaid 6%.

Harvendusraiate mõju hindamisel juurepessu osakaalule selgus, et harvendatud puistutes (31%) ei ole juurepessu osakaal statistiliselt oluliselt suurem võrreldes harvendamata (33%) puistutega. Samuti ei erine kuuse enamusega puistutes statistiliselt oluliselt juurepessu osakaal nooremas (41-60 a.) (32,5%) ja vanemas (61-80 a.) (31,5%) vanusevahemikus. Raiete kordade (harvendamata, 1x harvendatud, 2x harvendatud) mõju hindamisel juurepessu levikule selgus, et statistiliselt oluline erinevus ($p < 0,001$) esineb vaid nooremas (41-60 a.) vanusevahemikus, kus juurepessu osakaal oli madalam kaks

korda harvendatud puistutes (8%) võrreldes üks kord harvendatud (50%) ja harvendamata (27%) puistutega. Vanemas (61-80 a.) vanusevahemikus oluline erinevus raiete kordade vahel puudub. Põlisel metsamaal (37%) esines juurepessu enam võrrelduna endise põllumaaga (26%). Positiivset mõju juurepessu levikule avaldas okas- (s.o. kuuske on 50% ja enam) ja lehtpuu osakaal (kuni 40% lehtpuud) puistus, suurendades juuremädanike esinemise riski. Samuti avaldasid olulist mõju juurepessu osakaalule mulla pH ja magneesiumi-, kaaliumi- ja fosfori sisaldus mullas. Aluseline muld ja suurem magneesiumi sisaldus mullas avaldasid positiivset mõju juurepessu levikule, mille tulemusel juurepessu osakaal puistus suurenes. Kuid vastupidine mõju oli suuremal mulla kaaliumil ja fosfori sisaldusel, mille tõttu juurepessu osakaal puistus vähenes.

Kasvukohatüübi (sinilille, jänsekapsa ja naadi) ja diameetri koosmõju hinnangust juurepessu kahjustuse osakaalule selgus, et enim on juurepessu poolt kahjustatud suurema diameetriklassi (70-80 cm) puistud, mis asuvad sinilille kasvukohatüübis.

Uue põlvkonna sekveneerimisega analüüsi (N=504) teisi võimalikke mädanikutekitajaid harilikul kuusel, neid tuvastati koos juurepessu, külmaseene ja verve nahkisega kokku 225 puiduproovist (44,9%). Saadud tulemustest selgus, et mädaniku tekitajate osakaal harilikul kuusel jaguneb tekitajate järgi järgmiselt: juurepess 31,9%, külmaseen 1,6%, verev nahkis 4,5% ja teised mädaniku tekitajad 6,9%. Koos juurepessu, külmaseenele ja verev nahkisega esines teisi mädaniku tekitajaid mõlemas vanusevahemikus, need on *Fomitopsis* sp. (9,3% analüüsitud proovidest), *Hyphodontia* sp. (5,8%) ja *Onnia* sp. (4,2%) ning harvendamata puistutes esines *Fomitopsis* sp. (3,2%), *Antrodia* sp. (2,2%) ja *Ganoderma* sp. (1,6%).

Tulemuste mõtestamisel tuleb arvestada, et pole arvesse võetud eelmise metsapõlvkonna- ja lähedal asuvate metsade tervislikku seisundit, mis võib mõjutada uuritavate puistute juurmädanike esinemist ja kahjustuse ulatust.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aastaraamat Mets 2014.** (2016). Tartu. Keskkonnaagentuur. 242 lk
- Aastaraamat Mets 2017.** (2018). Tallinn. Keskkonnaagentuur. 292 lk.
- Anslan, S., Bahram, M., Hiiesalu, I., Tedersoo, L.** (2017). PipeCraft: Flexible open-source toolkit for bioinformatics analysis of custom high-throughput amplicon sequencing data. – *Molecular Ecology Resources*, 17(6).
- Asiegbu, F. O., Adomas, A., Stenlid, J.** (2005). Conifer butt and root rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *S.I.* – *Molecular plant pathology*, 6 (4), pp. 395-409.
- Berglund, M.** (2005). Infection and growth of *Heterobasidion* spp. in *Picea abies*. Control by Phlebiopsis gigantea stump treatment. Doctoral thesis. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae:36. Swedish University of Agricultural Sciences, 41 p. + append.
- Cruickshank, M.G.** (2011). Yield reduction in spruce infected with *Armillaria solidipes* in the southern interior of British Columbia. – *Forest Pathology*, 41, pp. 425-428.
- Drenkhan, T.** (2006). Bioregulaator Rotstop®'i kasutamine juurepessu profülaktikas: Magistritöö. Eesti Maaülikool, Metsandus- ja maaehitusinstituut, metsakasvatuse osakond, Tartu. 80 lk + lisad.
- Drenkhan, T.** (2011). Bioregulaator Rotstop juurepessu vastu. – *Eesti Mets*, 2. [http://www.loodusajakiri.ee/eesti_mets/artikkel1163_1144.html] (14.01.19).
- Drenkhan, T.** (2014). KIK metsanduse programmi projekti nr 3698 „Olulisimate juuremädanike tekitajate leviku ja kahjustuse uuring Eestis“ lõpparuanne. Eesti Maaülikool, Metsandus- ja maaehitusinstituut, Tartu. [http://mi.emu.ee/userfiles/instituudid/mi/MI/Projektid/projekt_3698_juurem%C3%A4dani_kud_juuni2014.pdf] (03.04.2019)
- Drenkhan, T., Drenkhan, R., Rähn, E., Adamson, K., Padari, A., Pilt, E., Jürimaa, K.** (2014). Juuremädanike levik on arvatust ulatuslikum. – *Eesti mets*, 4, lk 39-43. [<http://eesti-mets-arhiiv.horisont.ee/Eesti-Mets-4-2014.pdf>] (10.03.2019)
- e-Elurikkus** (2019). Eesti eluslooduse andmebaas. <http://vana.elurikkus.ut.ee/> (25.03.2019).
- Guillaumin, J.-J., Legrand, P.** (2013). *Armillaria* Root Rots. In: *Infectious Forest diseases* (ed. by Gonthier, P., Nicolotti, G.) Wallingford, Boston. pp. 159-177.
- Hanso, M., Drenkhan, R.** (2007). Metsa- ja linnapuud ilmastiku äärmuste vaevas. *Eesti Loodus*, 58(4), lk 6-13.
- Hanso, M., Õunap, H.** (2016). Olulisemad metsakahjustused ja nende vältimine. Tartu: SA Erametsakeskus. 44 lk.

- Hanso, S., Hanso, M.** (1999a). Andmeid juuremädanike tekitajate kohta Eesti metsadest. Metsanduslikud uurimused XXXI, lk 141-161.
- Hanso, S., Hanso, M.** (1999b). Juurepessu levimisest Eesti metsades. - Metsanduslikud uurimused XXXI, 31, lk 162-172.
- Hantula, J., Vainio, E.** (2003). Specific primers for the differentiation of *Heterobasidion annosum* (s.str.) and *H. parviporum* infected stumps in Northern Europe. – Silva Fennica, 37 (2), pp. 181- 187.
- Holdenrieder, O. & Greig, B.J.W.** (1998). Biological methods of control. Chapter 13, in: Woodward, S.; Stenlid, J.; Karjalainen, R.; Hüttermann, A., (eds.). *Heterobasidion annosum*: Biology, ecology, impact and control. CAB International, 589 p.
- Hubert, E.E.** (1935). A disease of conifers caused by *stereum sanguinolentum*. University of Idaho. Journal of Forestry. pp. 485-489.
- Kallio, T.** (1976). *Peniophora gigantea* (Fr.) Masee and wounded spruce (*Picea abies* L.).Part II. Acta Forestalia Fennica 149. 18 p.
- Karu, A.** (1953). Juurepessu (*Fomes annosus*) kahjustuse olenevus mullastiku tingimustest Eesti NSV kuusepuistutes. – Rmt: Haberman, H. (toim.). Loodusuurijate Seltsi juubelikoguteos. Tallinn: Eesti Riiklik Kirjastus, lk 196-228.
- Kerr, G., Haufe, J.** (2011). Thinning Practice A Silvicultural Guide version 1.0.United Kingdom: Forestry Commision. 54 p.
- Korhonen, K.** (1978). Intersterility groups of *Heterobasidion annosum*. Communicationes Instituti Forestalis Fenniae 94 (6), 25 p.
- Korhonen, K., Delatour, C., Greig, B.J.W., Schönhar, S.** (1998). Silvicultural Control. – In: *Heterobasidion annosum*: Biology, Ecology, Impact and Control. /Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A. (eds.). Wallingford: CAB International, pp. 283- 313.
- Korhonen, K., Stenlid, J.** (1998). Biology of *Heterobasidion annosum* – In: *Heterobasidion annosum*: Biology, Ecology, Impact and Control. /Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A. (eds.). Wallingford: CAB International, pp. 43-70.
- Laine, L.** (1976). The occurence of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. in woody plants in Finland, Metsäntutkimuslaitoksen Julkaisuja, 90 (3), 53 p.
- Lamour, A., Jeger, J.M.** (2000). Quantitative aspects of the epidemiology of *Armillaria* in the field. – In. *Armillaria* root rot Biology and Control of Honey Fungus. /Fox, V.T.R. (ed.). Gosport: Ashford Colour Press Limited, pp. 65-77.
- Larsson, K-H., Parmasto, E.,Fischer, M., Langer, E., Naksone, K.K., Redhead, A.S.** (2006). Hymenochaetales: a molecular phylogeny for the hymenochaete clade. Mycologia, 98(6), pp. 926- 936.
- Lõhmus, A., Kraut, A., Lõhmus, P., Remm, J., Rosenvald, R., Soon, M.** (2005). Haab pakub elupaiku vähemalt kahele tuhandele liigile. – Eesti Loodus, 10, lk 6–15.

- Marxmüller, H.** (1982). Etude morphologique des *Armillaria* s. str. à anneau. – Bull. Soc. mycol. France 98, pp. 87–124.
- Metsa majandamise eeskiri.** (vastu võetud 27.12.2006, viimati jõustunud 12.01.2007). – Riigi Teataja <https://www.riigiteataja.ee/akt/115122017017> (22.02.2019).
- Muiste, L.** (1965). Kuuse kultuurpuistud Viljandi Metsamajandis. EPA teaduslike tööde kogumik, nr. 41, lk 72–84.
- Niemelä, T.** (2008). Torikseened Soomes ja Eestis. Tartu: Eesti Loodusfoto. 320 lk.
- Piri, T.** (1996). The spreading of S-type *Heterobasidion annosum* from Norway spruce stumps to the subsequent tree stand. – Eur. J. For. Path., 26, pp. 193–204.
- Piri, T., Korhonen, K.** (2007). Spatial distribution of persistence of *Heterobasidion parviporum* genets on a Norway spruce site. – Forest Pathology, 37, pp. 1-8.
- Piri, T., Korhonen, K.** (2008). The effect of winter thinning on the spread of *Heterobasidion parviporum* in Norway spruce stands. – Canadian Journal of Forest Research, 38, pp. 2589-2595.
- Prospero, S.** (2003). Ecology of *Armillaria cepistipes*: population structure, niches, pathogenicity and interactions with *Armillaria ostoyae*: Thesis. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich. 127 p.
- Redfern, D. B.** (1982). Infection of *Picea abies* and *Pinus contorta* stumps by basidiospores of *Heterobasidion annosum* – European Journal of Forest Pathology, 25, pp. 357–365.
- Riit, T.** (2014). PCR praimerid taimede seenpatogeenide tuvastamiseks. Magistritöö. Tartu: Tartu Ülikool, 58 lk. [11.09.2014]
- Roll-Hansen, F., Roll-Hansen, H.** (1995). On diseases and pathogens on forest trees in Norway 1966 – 1975, part I. – Communications of Norwegian Forest Research Institute, 479, 63 p.
- Rosenvald, R.; Drenkhan, R.; Riit, T.; Lõhmus, A.** (2015). Towards silvicultural mitigation of the European ash (*Fraxinus excelsior* L.) dieback: the importance of acclimated trees in retention forestry. Canadian Journal of Forest Research, 45 (9), pp. 1206–1214.
- Rönnerberg, J., Berglund, M., Johansson, U.** (2007). Incidence of butt rot at final felling and at first thinning of the subsequent rotation of Norway spruce stands in south-western Sweden. – Silva Fennica, 41 (1), pp. 639-641.
- Stenlid, J.** (1987). Controlling and predicting the spread of *Heterobasidion annosum* from infected stumps and trees to *Picea abies*. – Scandinavian Journal Forest Research, 2, pp. 187–198.
- Sturrock, R. N., Frankel, S.J., Brown, A.V., Hennon, P.E., Kliejunas, J.T., Lewis, K.J., Woods A.J.** (2011). Climate change and forest diseases, Plant Pathology 60, pp. 133-149.
- Swedjemark, G., Stenlid, J.** (1993). Population dynamics of the root rot fungus *H. annosum* following thinning of *Picea abies*. – Oikos, 66, pp. 247–254.

- Tarus, P. K., Lang'at-Thoruwa, C.C., Wanyonyi, A.W., Chhabra, S. C.** (2003). Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. – Chemical Society of Ethiopia. 17(2), pp. 185-190.
- Tedersoo, L., Bahram M., Pölme S., Kõljalg U., Yorou N. S., Wijesundera R., Villarreal Ruiz L., Vasco-Palacios A. M., Thu P. Q., Suija A., Smith M. E., Sharp C., Saluveer E., Saitta A., Rosas M., Riit T., Ratkowsky D., Pritsch K., Põldmaa K., Piepenbring M., Phosri C., Peterson M., Parts K., Pärtel K., Otsing E., Nouhra 37 E., Njouonkou A. L., Nilsson R. H., Morgado L. N., Mayor J., May T. W., Majuakim L., Lodge D. J., Lee S. S., Larsson K. H., Kohout P., Hosaka K., Hiiesalu I., Henkel T. W., Harend H., Guo L. D., Greslebin A., Grelet G., Geml J., Gates G., Dunstan W., Dunk C., Drenkhan R., Dearnaley J., De Kesel A., Dang T., Chen X., Buegger F., Brearley F. Q., Bonito G., Anslan S., Abell S., Abarenkov, K.** (2014). Global diversity and geography of soil fungi. – Science 346, Issue 6213, pp. 1256688-1–1256688- 10.
- Thor, M.** (1997). Stump treatment against *Heterobasidion annosum* – Techniques and biological effect in practical forestry. Master thesis. Licentiatavhandling, Department of Forest Mycology and Pathology, Uppsala, 21 pp. + annex.
- Thor, M.,** (2003). Operational stump treatment against *Heterobasidion annosum* in European forestry – Current situation. In: LaFlamme, G., Be'rube', J., Bussie`res, G. (Eds.), Root and butt rot of forest trees. Proceedings of the IUFRO Working Party 7.02.01, Quebec City, Canada, 16–22 September 2001. Canadian Forest Service, Information Report LAU-X-126, pp. 170– 175.
- Tjoelker, M. G., Boratynski, A., Bugala, W.** (2007). Biology and Ecology of Norway Spruce. The Netherlands: Springer. 460 p.
- Vasiliauskas, R.** (1998). Five basidiomycetes in living stems of *Picea abies*, associated with 7–25 year-old wounds. – Baltic Forestry, 4 (1), pp. 29–35.
- Vasiliauskas, R., Stenlid, J.** (1998). Fungi inhabiting stems of *Picea abies* in a managed stand in Lithuania. – Forest Ecology and Management, 109 (1–3), pp. 119–126.
- Voolma, K., Õunap, H.** (2000). Metsakaitse: Metsakahjustused ja nende vältimine. Tartu: Maaelu Arengu Instituut. 57 lk.
- West, S.J.** (2000). Chemical Control of *Armillaria*. – In. *Armillaria* root rot Biology and Control of Honey Fungus. /Fox, V.T.R. (ed.). Gosport: Ashford Colour Press Limited, pp. 173-182.
- Westwood, R.A., Conciatori, F., Tardif, C.J., Knowles, K.** (2011). Effects of *Armillaria* root disease on the growth of *Picea mariana* trees in the boreal plains of central Canada. [<http://e-bangla.blogspot.com/2011/12/effects-of-armillaria-root-disease-on.html>] (17.03.19).
- Whitney, R. D.** (1995). Root-rotting fungi in White spruce, Black spruce, and Balsam fir in northern Ontario. – Canadian Journal Forest Research, 25(8), pp. 1209–1230.

LISAD

Lisa 1. Analüüsitud kuuse enamusega puistud vanusevahemikus 41-80 aastat

Kvartal, eraldus	Puistu koosseis (%)	KKT	Harvendatud (1)/harvendamata (0)	Vanusevahemik 41-60 (C) 61-80 (D)	Puistu keskmine vanus (a)	Harvendusraiate arv (1/2)	KU keskmine diameeter 0,2m kõrguselt (cm)	Endine põllumaa (0); põline metsamaa (1)	Juurepessu osakaal puistus (%)	Külma-seene osakaal puistus (%)	Verev nahkise osakaal puistus (%)
KM075-7	99KU1KS	JK	1	C	51	2	28	1	33,3	0	0
KS030-26	95KU5MA	JK	1	C	56	1	27	0	16,7	0	0
SV080-5	95KU5MA	JK	1	C	42	1	27	1	16,7	0	16,7
LA161-22	100KU	SL	1	C	58	1	39	1	16,7	0	8,3
VL394-20	92KU5KS3HB	JK	1	C	54	1	29	1	83,3	0	0
VZ211-7	100KU	SL	1	C	48	1	30	1	58,3	0	16,7
OP084-14	90KU10KS	JK	1	C	50	1	27	1	25	0	0
PM232-13	100KU	SL	1	C	57	1	32	1	25	0	25
PE018-10	95KU5MA	JK	1	C	43	1	28	1	58,3	0	16,7
VA146-16	90KU10KS	JK	1	C	51	2	30	1	8,3	0	0
KM051-11	99KU1KS	JK	1	C	50	2	22	1	8,3	0	8,3
AK092-5	100KU	JK	1	C	51	2	30	1	16,7	0	0
QT078-4	97KU3MA	JK	1	C	43	2	30	1	0	0	0
LA182-2	95KU5MA	JK	1	C	54	1	29	1	41,7	0	0
PM191-19	80KU20KS	SL	1	C	41	1	23	1	8,3	8,3	8,3
PM176-13	100KU	JK	1	C	56	1	31	1	41,7	0	8,3
VA063-26	95KU5KS	JK	1	C	46	1	24	0	41,7	0	8,3
TT113-6	75KU15KS10HB	JK	0	C	48(52)	0	21	1	8,3	0	0
TT052-17	95KU5HB	ND	0	C	54	0	32	1	25	0	0
OP044-14	75KU5MA15KS5 HB	SL	0	C	60	0	36	1	16,7	0	0

JS267-2	85KU15KS	JK	0	C	48	0	32	1	0	0	0
CK146-20	80KU15KS5HB	ND	0	C	48	0	29	1	58,3	0	0
VZ253-1	95KU5KS	SL	0	C	55	0	30	1	58,3	0	0
VA020-7	95KU5KS	JK	0	C	45	0	34	1	8,3	0	0
TT038-3	90KU8KS2HB	JK	0	C	47	0	28	1	8,3	0	0
OP026-7	95KU5KS	SL	0	C	44	0	25	1	16,7	0	0
RG098-17	100KU	JK	0	C	52	0	25	1	25	0	33,3
RG120-8	95KU5MA	JK	0	C	57	0	26	1	41,7	0	25
PM245-15	95KU5KS	SL	0	C	59	0	26	1	41,7	0	8,3
VA109-2	80KU15KS5HB	JK	0	C	58	0	33	1	50	0	0
PE139-16	80KU5MA14KS1 HB	SL	0	C	58	0	30	1	66,7	0	0
OP070-6	86KU7KS7HB	JK	0	C	43	0	31	1	41,7	0	0
TT115-1	80KU10MA5KS5 HB	JK	1	D	72	1	38	1	25	0	0
VL525-2	85KU15MA	JK	1	D	64	1	25	1	25	0	16,7
EV146-19	100KU	JK	1	D	79	1	37	0	16,7	8,3	16,7
EV006-10	95KU5KS	JK	1	D	77	1	36	1	16,7	8,3	0
LA176-16	80KU15MA5KS	JK	1	D	68	1	32	1	50	0	0
OP096-13	100KU	JK	1	D	65	2	30	0	33,3	0	0
TT108-3	100KU	JK	1	D	66	2	28	1	16,7	0	0
VA155-2	95KU5MA	JK	1	D	68	2	33	1	25	0	0
TT110-11	100KU	JK	1	D	69	1	31	1	8,3	8,3	0
KJ089-11	68KU23MA9KS	JK	1	D	70	1	41	1	8,3	0	16,7
AK069-6	70KU10MA18KS 2HB	JK	1	D	76	2	34	1	33,3	0	16,7
VA056-8	94KU5KS1HB	JK	1	D	69	1	31	1	25	16,7	16,7
VZ243-2	95KU5HB	SL	1	D	65	1	34	1	41,7	0	0
SV079-1	90KU10KS	JK	1	D	61	1	26	1	33,3	0	8,3

VL394-14	85KU5MA10KS	JK	1	D	66	1	31	1	50	0	0
TT079-8	60KU5MA30KS5 HB	JK	0	D	71	0	40	1	25	0	0
JS230-5	75KU5MA12KS8 HB	ND	0	D	75	0	41	1	25	0	0
OP051-14	91KU2MA5KS2 HB	SL	0	D	73	0	35	1	16,7	0	0
PM319-9	79KU11KS10HB	ND	0	D	66	0	35	1	50	0	0
CK227-9	69KU1MA30KS	ND	0	D	65	0	38	0	16,7	0	0
TT033-13	63KU32KS5HB	ND	0	D	66	0	34	0	33,3	0	0
PE011-20	95KU2MA2KS1 HB	JK	0	D	74	0	31	1	50	0	8,3
TT097-2	80KU10KS10HB	JK	0	D	71	0	35	0	16,7	8,3	0
KM014-12	83KU7MA7HB	JK	0	D	61(67)	0	42	1	50	8,3	0
OP026-10	70KU30MA	SL	0	D	70	0	36	0	16,7	16,7	0
OP051-9	100KU	SL	0	D	76	0	28	1	25	0	0
TT242-8	95KU5MA	ND	0	D	79	0	39	1	33,3	0	0
PE075-8	70KU10MA15KS 5HB	ND	0	D	74	0	35	1	33,3	16,7	0
PE139-9	86KU7MA7HB	SL	0	D	68	0	37	1	66,7	0	0
OP072-17	75KU2MA15KS8 HB	JK	0	D	66	0	38	1	66,7	0	0
KJ091-7	65KU30MA5HB	JK	1	D	74	1	35	1	41,7	0	0

**Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks
ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Mina, Kätlin Piiskop,
(sünnipäev 01/03/1995, 49503010810)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö
Juure- ja tüvemädanike kahjustused 41-80 aastastes hariliku kuuse (*Picea abies* (L.) H. Karst.)
puistutes,

mille juhendajad on Elisabeth Rähn, Tiia Drenkhan ja Rein Drenkhan,

1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,

1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja

1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor

allkiri

Tartu, 3.06.2019

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)